EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:
P. HUBER · R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA
Basel Lausanne Bern Zürich

Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL
SUISSE — SCHWEIZ — SVIZZERA — SWITZERLAND

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
JUL 20 '55

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

E. URBANI: Gli enzimi proteolitici nella cellula e nell'embrione 209

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

A. ZAFFARONI, C. CASAS CAMPILLO, F. CORDOBA, and G. ROSENKRANZ: Steroids. LXVI. Microbiological Hydroxylation of Steroids in Position 21 219
M. DANIELS, G. SCHOLES, and J. WEISS: Studies on the Action of X-Rays on Aqueous Solutions of Nucleic Acids and Some Nucleotides 219
A. BAJER: Living Smears from Endosperm 221
M. K. DUTT: Chromosome Structure and Meiosis in a Pentatomid Bug 223
S. MAKINO: Notes on the Cytological Feature of Male Sterility in the Mule 224
P. MANDEL, L. FRUHLING et J. D. WEILL: De l'existence d'une multiplication de noyaux dans le cerveau du rat après la naissance 226
W. BOLLAG: Heterologe Transplantation von Tumoren bei Vorbehandlung der Empfängertiere mit Gewebe der Spendertiere während der Embryonalzeit 227
U. SALERA, G. TAMBURINO und S. FINOCCHIARO: Die Eisenaufnahme der Normoblasten in Bezug auf ihre Reifungsaktivität 227
O. BRAUN-FALCO und B. RATHJENS: Über Vorkommen von Kohlensäureanhydratase in der menschlichen Haut . 229
F. VERZÁR: Veränderungen der thermoelastischen Eigenschaften von Sehnenfasern beim Altern 230
F. VERZÁR: Veränderungen der thermoelastischen Kontraktion von Haut und Nerv bei alternden Tieren 230
N. FRIES: Vitamin Requirements of Decotylised Pea Seedlings Cultivated in the Dark 232
A. FALBRIARD, R. ZENDER, M. C. SANZ et A. FRANCESCHETTI: Le potassium et le sodium de l'humeur aqueuse du lapin et leurs variations sous l'effet de l'acétazolamide (Diamox) 232
A. FALBRIARD et H. GANGLOFF: Action d'un inhibiteur de la carboanhydrase, l'acétazolamide, sur l'excitabilité du cortex, du thalamus et du rhinencéphale 234
J. JACOB et M. DECHAVASSINE: Actions de la néostigmine, du D. F. P. et du 3318 CT sur la sensibilité du rectus de grenouille aux esters acétique, propionique et butyrique de la choline 235
H. KLIEWE und G. GILLISSEN: Die C-17-Ketosteroidausschüttung nach Gaben von Äthanol und Wein 237
H. KLIEWE und G. GILLISSEN: Der Antagonismus von schwefliger Säure und Äthanol im Hinblick auf die NNR.-Funktion 237
L. GYERMEK and GY. FEKETE: On the Vasopressor and Antidiuretic Activities of Synthetic Oxytocin 238
G. F. BAHR: Larger Section Areas for Electron Microscopy by Aid of Ultrasonics (Pro Experimentis) 239
M. M. PAYAK: A Modified Petri Dish Method for Rust Infection of Excised Leaves (Pro Experimentis) 239
P. W. JUNGBLUT, BEATRIX LOHMANN, R. SCHOBER und F. TURBA: Eine Methode zur fortlaufenden Blutentnahme aus der Vena portae von Hunden (Pro Experimentis) 241

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

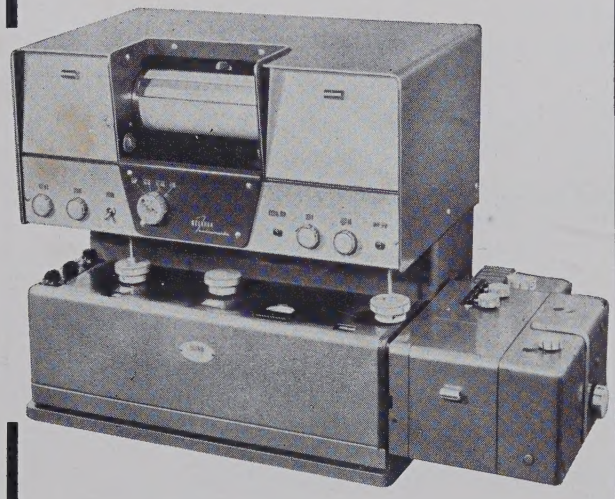
Studiorum progressus: P. DESAIVE et JOSEPHINE VARETTO-DENOËL: Influence de la β-mercaptoéthylamine sur la réponse de l'intestin grêle du rat à une irradiation rœntgénienne localisée 242

Neu!

BECKMAN-

MODELL DR

Automatik-Zusatz zum
Quarz-Spektralphotometer
Modell DU



- Mißt und registriert vollautomatisch die Transmission von 1–3 Proben
- Aufzeichnung der Resultate in 3 verschiedenen Farben
- Wellenlängenbereich: 220 mμ bis 1000 mμ
- Meßgeschwindigkeit pro eingestellte Wellenlänge: 12 Sekunden für 3 Proben
- Volle Ausnützung der hohen DU-Präzision
- Automatische Spalteinstellung für optimale Auflösung
- Äußerst einfache Handhabung

Bitte verlangen Sie das BECKMAN-Bulletin 339/E

Auskünfte, Beratung und Angebote durch

GANZ & CO

BAHNHOFSTR. 40
TEL. (051) 23 97 73 *Zürich*

Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie

Revue suisse d'Hydrologie

Hydrographie, Hydrobiologie, Fischereiwissenschaft, Abwasserreinigung; Hydrographie, hydrobiologie, aquiculture, épuration des eaux polluées. – Herausgegeben von der Hydrobiologischen Kommission der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft – Erscheint seit 1920. – Redaktion: Professor Dr. O. Jaag, ETH., Zürich

Jährlich erscheinen 2 Hefte mit zusammen 400–500 Druckseiten. Abonnementspreis jährlich: Schweiz Fr. 24.–, Ausland sFr. 28.– (DM 28.–), Einzelheft sFr. 14.– (DM 14.–)

Preis der Bände 1 bis 10 (1920 bis 1948) zusammen Fr. 250.–; Band 11 (1948/49) Schweiz Fr. 48.–, Ausland sFr. 56.– (DM 56.–); Band 12 (1950) und folgende: Schweiz je Fr. 24.–, Ausland je sFr. 28.– (DM 28.–)

In Kürze erscheint Heft 1 (Band 17) 1955:

Aus dem Inhalt: F. Cosandey, *Etude hydrobiologique du lac de Bret.* Ingo Findenegg, *Trophiezustand und Seetypen.* O. Malchow-Møller, G. J. Bonde, and E. Fjerdingstad, *Treatment of Domestic Sewage in Lagoons.* H. Ambühl, *Die praktische Anwendung der elektrochemischen Sauerstoffbestimmung im Wasser.* Walter Höhn-Ochsner, *Dr. phil. h. c. Fritz Meister* †. Gottfried Huber-Pestalozzi, *Dr. Eugène Penard.* Buchbesprechungen.

Zu beziehen durch jede Buchhandlung

Birkhäuser Verlag
Basel · Stuttgart

EXPERIENTIA

Vol. XI - Fasc. 6 Pag. 209–248 15. VI. 1955

Gli enzimi proteolitici nella cellula e nell'embrione

Di E. URBANI[1], Roma

Introduzione

Nel corredo enzimatico delle cellule animali e vegetali sono reperibili vari fermenti proteolitici i quali sono stati prevalentemenți studiati nella loro possibilità di idrolisi di substrati diversi. Così sono state identificate e purificate varie dipeptidasi, tripeptidasi e proteinasi, le prime agenti su dipeptidi e tripeptidi, le seconde su protidi ad elevato peso molecolare come la caseina, l'emoglobina, la gelatina. Gli enzimi proteolitici intracellulari vanno distinti funzionalmente da quelli extracellulari perchè mentre questi ultimi agiscono fuori delle cellule preparando i materiali che verranno impiegati nel metabolismo, i primi sono direttamente ingranati nei processi vitali che hanno sede a livello del protoplasma. Nei protozoi e in cellule isolate, capaci di fagocitosi e per le quali si parla di digestione intracellulare, in realtà gli enzimi proteolitici compiono la demolizione dei prodotti alimentari non nel citoplasma ma in vacuoli.

A contatto del protoplasma arrivano perciò sia nei metazoi che nei protozoi i prodotti della digestione proteica, cioè gli aminoacidi, e si pone perciò la domanda di quale possa essere la funzione degli enzimi proteolitici intracellulari. In risposta a tale quesito varie ipotesi sono state avanzate. WILSTÄTTER e BAMANN[2] hanno chiamato col termine generico di «catepsine» gli enzimi proteolitici cellulari che avrebbero lo scopo di digerire il protoplasma quando la cellula è morta. Alle catepsine sarebbero perciò dovuti i fenomeni di autolisi che si verificano nei tessuti morti tenuti in condizioni di asepsi. Questa concezione, che ha senza dubbio una parte di verità, è attendibile solamente per quegli enzimi che hanno un pH di azione in gamma acida come le proteinasi ma non è verosimile per le dipeptidasi che funzionano a pH prossimi alla neutralità cioè nel protoplasma vivente e non morto. Per questo motivo e per altri, che saranno esposti in seguito, è da ritenere che non tutti gli enzimi proteolitici abbiano una funzione postmortale ma intervengano invece direttamente nei fenomeni metabolici della cellula.

[1] Istituto di Anatomia Comparata «G. B. GRASSI» della Università, Roma.

[2] R. WILLSTÄTTER e E. BAMANN, Z. Physiol. Chem. *180*, 127 (1929).

Così per le dipeptidasi DUSPIVA[1] ha avanzato l'ipotesi che il loro compito consista nella demolizione dei peptidi che compaiono continuamente con il rinnovamento delle proteine protoplasmatiche.

Molti autori hanno da tempo prospettato l'idea che la funzione degli enzimi proteolitici intracellulari sia quella della sintesi delle proteine. Cioè quei fermenti che normalmente studiamo con la scissione di substrati, in realtà nel protoplasma provvedono alla edificazione della molecola proteica a partire dagli aminoacidi.

Ad appoggio di questa teoria vi sono le classiche esperienze di DANILEWSKI (1886)[2], WASTENEYS e BORSOOK (1930)[3], BERGMANN e FRAENKEL-CONRAT (1938)[4], VIRTANEN e Coll. (1949)[5] che hanno ottenuto *in vitro* la sintesi di peptidi (plasteina) facendo agire gli enzimi proteolitici su idrolizzati proteici concentrati[6].

La concezione che gli enzimi proteolitici possano realizzare il legame peptidico non è contraria ai presupposti teorici della enzimologia: è noto infatti che lo stesso enzima può, a seconda delle condizioni energetiche del sistema, agire sia nel senso della analisi che nel senso della sintesi di un legame, essendo la catalisi enzimatica teoricamente reversibile (TERROINE[7]).

BORSOOK[8] e LINDERSTRØM-LANG[9] hanno compiuto uno studio delle condizioni termodinamiche necessarie perchè le peptidasi possano agire nel senso della

[1] F. DUSPIVA, Protoplasma *32*, 211 (1939).

[2] H. DANILEWSKI, citato in E. F. TERROINE, *La synthèse protéique* (C.N.R.S., Parigi 1952).

[3] H. WASTENEYS e H. BORSOOK, cit. da H. BORSOOK, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*, Vol. IX (ED. ZECHMEISTER, Vienna, 1952).

[4] M. BERGMANN e H. FRAENKEL-CONRAT, J. Biol. Chem. *124*, 1 (1938).

[5] A. VIRTANEN, citato da H. BORSOOK, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*, Vol. IX (ED. ZECHMEISTER, Vienna, 1952).

[6] Si vedano: E. L. SMITH in «*The Enzymes*». Edited by J. B. SUMNER and K. MYRBÄCK, Vol. I, parte 2ª (Acad. Press. Inc., New York 1951). – J. B. SUMNER e G. F. SOMERS, *Chemistry and Methods of Enzymes* (Acad. Press. Inc., New York 1953), e la recente rassegna di RUSSO-CAIA e ROGNONE, dedicata al ruolo di alcuni sistemi cellulari nella sintesi delle proteine («Ricerca scientifica», ottobre 1954).

[7] E. F. TERROINE, *La synthèse protéique* (C.N.R.S., Parigi 1952).

[8] H. BORSOOK, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*, Vol. IX (ED. ZECHMEISTER, Vienna 1952).

[9] K. U. LINDERSTRØM-LANG, *Proteins and Enzymes*, Lane Medical Lect. (Standford University Press, 1952).

sintesi e si è visto che tali condizioni sono possibili e compatibili con lo stato fisiologico delle cellule.

Prove dirette e concrete che gli enzimi proteolitici svolgano nel protoplasma attività di sintesi delle proteine per ora non esistono ma vi sono una serie di fatti, frutto della sperimentazione su materiali diversi, che rendono verosimile questa ipotesi (BRACHET[1], FRUTON[2], BERGMANN e FRAENKEL-CONRAT[3], LINDERSTRØM-LANG[4], ROTSCHILD e JUNQUEIRA[5]).

Scopo di questa rassegna non è la dimostrazione delle attività sintetiche degli enzimi proteolitici ma l'esposizione di alcuni risultati ottenuti in gran parte nel nostro Istituto con lo studio delle dipeptidasi e proteinasi su materiali diversi in condizioni normali e sperimentali; molte volte lo studio di questi enzimi è stato accompagnato da dosaggi dell'acido ribonucleico per considerazioni alle quali conviene accennare.

È nota l'importanza attribuita agli acidi nucleici nei fenomeni di sintesi ma il meccanismo con il quale l'RNA interverrebbe nella sintesi delle proteine è ignoto e si può solamente congetturare in merito. Comunque gli acidi pentosonucleici possono essere considerati degli «indicatori» delle attività sintetiche della cellula (COTRONEI[6]).

Un aspetto interessante della questione è dato dalle ricerche di BINKLEY[7] il quale ha dimostrato che la dipeptidasi che idrolizza la cisteinilglicina ha una struttura nucleotidica. Vi sarebbero perciò degli acidi nucleici che posseggono una attività dipeptidasica. In realtà non è stato ancora possibile dimostrare che gli acidi pentosonucleici abbiano possibilità enzimatiche e CHANTRENNE[8] con la centrifugazione frazionata non ha trovato parallelismo di localizzazione tra cisteinilglicinadipeptidasi e RNA.

Le ricerche di BINKLEY hanno il merito di aver aperto una nuova strada allo studio degli acidi nucleici e mentre da un lato ci si augura che esse vengano confermate conviene non trascurare lo studio comparativo degli acidi nucleici e delle dipeptidasi. Molte volte infatti si è visto, come sarà indicato nella presente rassegna, che acido ribonucleico e dipeptidasi presentano un parallelismo di comportamento (URBANI[9]) altre volte questo parallelismo non è evidente e questo potrebbe giustificare il disaccordo tra i risultati di BINKLEY e quelli di CHANTRENNE.

Metodi di Studio

A. *Dipeptidasi.* L'attività dipeptidasica degli omogenati, eseguiti in acqua distillata, è stata misurata con il metodo di LINDERSTRØM-LANG e HOLTER, substrato *d-l*-alanilglicina[1] 0,2 M sciolta in NaOH alla molarità necessaria per ottenere il pH desiderato. Titolazione degli aminogruppi liberati con HCl 0,06 N in ambiente acetonico, rosso naftile come indicatore. L'attività enzimatica viene espressa in μl HCl 0,06 N. È stato usato anche il metodo cromatografico che ha dato risultati qualitativamente soddisfacenti (URBANI, ROGNONE, RUSSO[2]).

B. – *Proteinasi.* L'attività proteinasica degli omogenati eseguita in acqua distillata è stata determinata con il metodo di DUSPIVA con gli adattamenti portati da HOLTER e LØVTRUP[3]. Substrato: caseina portata al pH voluto con tampone fosfato, citrato ammonio. Il colore dell'idrolizzato proteico è stato sviluppato con il reattivo di Folin-Ciocalteau e letto al microscopio a cellula fotoelettrica (URBANI[4]). L'attività proteinasica può essere espressa in unità di tirosina liberata dalla idrolisi enzimatica o direttamente in estinzione.

C. – *Acido ribonucleico.* L'estrazione dell'acido ribonucleico è stata fatta con acido perclorico al 10% secondo la tecnica di OGUR e ROSEN con le modifiche introdotte da STEINERT[5]. Il dosaggio dell'RNA estratto è stato fatto in microcuvette di quarzo al microscopio di quarzo con cellula fotoelettrica 1 P 28 RCA (URBANI[6], URBANI e DE CESARIS COROMALDI[7], URBANI e SALVIDIO[8]). Le estinzioni lette sono state tradotte in γ RNA a mezzo di una curva di taratura eseguita con acido ribonucleico Schwarz del lievito.

D. – *Peso ridotto.* Per il lavoro su materiale embriologico è stato necessario eseguire il peso ridotto di embrioni e di parti di embrioni di Anfibi. Per questo è stato determinato il peso ridotto RW (ZEUTHEN[9]) a mezzo di bilancia a diavoletto di Cartesio con l'attrezzatura del microrespirometro di LINDERSTRØM-LANG e HOLTER (URBANI[10]).

E. – *Consumo di O_2.* Il consumo di ossigeno degli embrioni di *Bufo vulgaris* tagliati allo stadio di bottone caudale in tre parti (cefalica, intermedia, caudale) è stato determinato con il microrespirometro di GREGG modificato da BRACHET[11]. I risultati sono perfettamente

[1] J. BRACHET, Exp. Ann. Bioch. Med. Ser. XII, *1951*, 1.

[2] J. S. FRUTON, Yale J. Biol. Med. *22*, 263 (1950).

[3] M. BERGMANN e H. FRAENKEL CONRAT, J. Biol. Chem. *119*, 707 (1937).

[4] K. U. LINDERSTRØM-LANG, Exp. Cell. Res. Suppl. *1*, 1 (1949).

[5] H. A. ROTHSCHILD e L. C. U. JUNQUEIRA, Arch. Bioch. and. Biophys. *34*, 453 (1951).

[6] G. COTRONEI, Rend. Adunanza solenne Acc. naz. Lincei del 4 giugno 1950, fasc. 5.

[7] F. BINKLEY, Nature *167*, 888 (1951); Exp. Cell. Res., Suppl. *2*, 145 (1952).

[8] H. CHANTRENNE, Arch. Internat. Physiol. *60*, 186 (1952).

[9] E. URBANI, Rend. Acc. naz. Lincei *16*, 556 (1954).

[1] Il dipeptide è stato fornito gentilmente dalla Ditta Hoffmann-La Roche (Basilea) che desidero vivamente ringraziare.

[2] E. URBANI, L. ROGNONE e S. RUSSO, Rend. Acc. naz. Lincei *13*, 300 (1952).

[3] H. HOLTER e S. LØVTRUP, C. r. Lab. Carlsberg, Sér. Chim. *27*, 27 (1949).

[4] E. URBANI, Ric. scient. *22*, 2174 (1952).

[5] M. STEINERT, Bull. Soc. Chim. Biol. *33*, 549 (1951).

[6] E. URBANI, Rend. Acc. naz. Lincei *15*, 308 (1953).

[7] E. URBANI e L. DE CESARIS COROMALDI, Ric. Scient. *24*, 1275 (1954).

[8] E. URBANI e E. SALVIDIO, Haematologica *38*, 1 (1954).

[9] E. ZEUTHEN, C. R. Lab. Carlsberg *26*, 243 (1948).

[10] E. URBANI, Ric. Scient. *17*, 5 (1947).

[11] J. BRACHET, Bull. Soc. Chem. Biol. *31*, 724 (1949).

concordanti con quelli ottenuti da STEFANELLI[1] con il suo microrespirometro sullo stesso materiale.

Risultati

I. – *Amebe.* Il corredo enzimatico delle amebe (*Amoeba proteus, Amoeba chaos*) è noto sopratutto grazie ai lavori di HOLTER e Coll. del Carlsberg Laboratorium. Questi Autori hanno messo in evidenza l'esistenza di numerosi enzimi tra i quali le dipeptidasi e le proteinasi. HOLTER e LØVTRUP[2] in *Amoeba chaos* (*Chaos chaos* L.) hanno dimostrato che le dipeptidasi si troverebbero legate al citoplasma ialino o ai microsomi o ad ambedue mentre le proteinasi sono legate ai mitocondri. Vi è perciò una differente localizzazione di queste due categorie di enzimi proteolitici. Lavorando in *Amoeba proteus* ho potuto dimostrare (URBANI[3]) che i frammenti nucleati di ameba mantengono inalterato il loro corredo enzimatico mentre i frammenti anucleati mostrano un diverso comportamento a seconda che si tratti delle dipeptidasi o delle proteinasi. Le dipeptidasi subiscono una diminuzione fino al terzo giorno della operazione e poi si mantengono stazionarie con valori che oscillano intorno al 40% in meno rispetto alle dipeptidasi dei frammenti nucleati. Le proteinasi invece mostrano lo stesso comportamento nei due tipi di frammenti (Fig. 1).

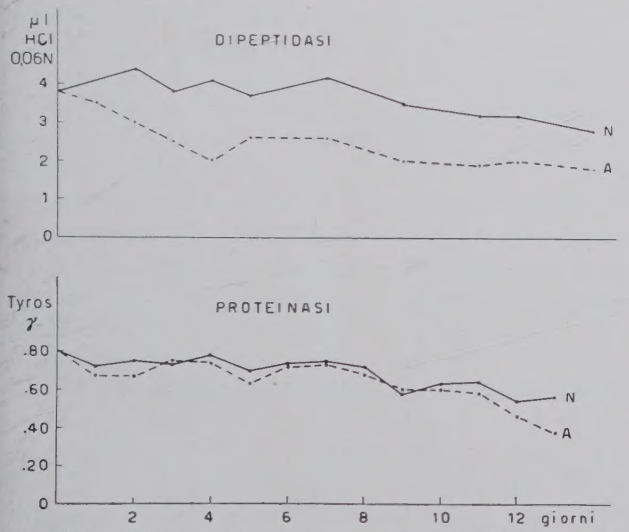


Fig. 1. Dipeptidasi e proteinasi nei frammenti nucleati (*N*) e anucleati (*A*) di *Amoeba proteus*. In ascisse i giorni dalla operazione, in ordinate l'attività enzimatica di 10 frammenti nucleati o nucleati tenuti a digiuno.

Queste osservazioni che rientrano nel quadro delle ricerche di BRACHET[4] sui rapporti tra nucleo e citoplasma sono state precedute dal lavoro di LINET e BRACHET[5] sul comportamento dell'RNA nei frammenti nucleati e anucleati di ameba. Dalle osservazioni qualitative e quantitative di questi Autori risulta che nei frammenti anucleati si ha una rapida caduta del tenore in RNA del citoplasma.

Poichè l'RNA citoplasmatico è localizzato nei microsomi e questi si trovano sotto il controllo nucleare è logico spiegare la scomparsa dell'RNA a seguito della asportazione del nucleo. Per quanto riguarda le dipeptidasi se si ammette che queste siano localizzate in parte nei microsomi e in parte nello ialoplasma si spiega la scomparsa di circa un 40% della attività dipeptidasica con la scomparsa dei microsomi. Le proteinasi invece, localizzate nei mitocondri, non sono influenzate dalla scomparsa del nucleo e lo stesso accade per le amilasi (URBANI[1]) che sono anche esse localizzate nei mitocondri.

BRACHET[2] ha recentemente coordinato questi risultati ed osserva che differenti proteine citoplasmatiche si trovano sotto un ineguale controllo nucleare, probabilmente dipendente anche dalla loro localizzazione: i mitocondri si dimostrano largamente indipendenti dalla influenza del nucleo mentre i microsomi si trovano sotto un diretto controllo nucleare. Rimane da osservare che c'è un certo parallelismo di comportamento tra dipeptidasi e RNA nei frammenti anucleati mentre non ve n'è alcuno tra proteinasi e RNA. Comportamento molto simile all'RNA hanno invece la fosfatasi acida e l'esterasi.

II. – *Eritrociti.* Un materiale sul quale abbiamo (SALVIDIO e URBANI[3], URBANI e SALVIDIO[4], RUSSO[5]) potuto estesamente studiare il comportamento delle dipeptidasi e dell'RNA è costituito dagli eritrociti di cinque classi di Vertebrati e degli eritroblasti di Mammifero.

Questo lavoro zoologico di citochimica comparata ha dato dei risultati che confermano quelli ottenuti sulle amebe ed ha permesso inoltre di trarre altre interessanti considerazioni. Per lo studio delle dipeptidasi sono stati esaminati gli eritrociti di *Carassius auratus, Triton cristatus, Rana esculenta, Bufo vulgaris, Lacerta viridis, Anser anser, Gallus domesticus, Mus musculus, Homo sapiens.*

Si è visto che le dipeptidasi sono negli eritrociti nucleati localizzate esclusivamente o quasi nel citoplasma in quanto i dosaggi eseguiti su nuclei isolati dei globuli rossi di *Triton* hanno mostrato una attività enzimatica trascurabile rispetto a quella del citoplasma.

L'esame comparativo degli eritrociti di cinque classi di Vertebrati ha dimostrato che la quantità di enzima di un eritrocita è «grosso modo» proporzionale al volume

[1] A. STEFANELLI, Arch. Sci. Biol. *27*, 71 (1941).

[2] H. HOLTER e S. LØVTRUP, C. r. Lab. Carlsberg, Sér. Chim. *27*, 27 (1949).

[3] E. URBANI, Arch. internat. Physiol. *60*, 189 (1952).

[4] J. BRACHET, *Recent Developments in Cell Physiology* (Butterworths Sci. Public. *1954*, pag. 91); *Le rôle des acides nucléiques dans la vie de la cellule et de l'embryon* (Masson & Desoer, Parigi 1952).

[5] N. LINET e J. BRACHET, Biochim. biophys. Acta *7*, 607 (1951).

[1] E. URBANI, Biochim. biophys. Acta *9*, 108 (1952).

[2] J. BRACHET, Biochim. biophys. Acta *14*, 449 (1954); *Recent Developments in Cell Physiology* (Butterworths Sci. Public. *1954*, p. 91.

[3] E. SALVIDIO e E. URBANI, Haematologica *37*, 1001 (1953); Exper. *10*, 25 (1954).

[4] E. URBANI e E. SALVIDIO, Haematologica *38*, 1 (1954).

[5] S. RUSSO, Haematologica *38*, 53 (1954).

dell'eritrocita stesso. La quantità di dipeptidasi per unità di volume protoplasmatico può essere considerata una costante negli eterotermi; negli omeotermi il tenore in dipeptidasi, per unità di volume, è minore che negli eterotermi.

Nei Vertebrati a sangue caldo presentanti i due tipi di eritrociti: nucleati (Uccelli) e anucleati (Mammiferi) il tenore in enzima è più basso nei Mammiferi ed inoltre è il minore rispetto a tutti gli altri Vertebrati.

Tabella I. – Dipeptidasi negli eritrociti dei Vertebrati

Specie	Optimum pH	Volume cellulare μ^3	Scissione standard μl HCl 0,06 N	Scissione Volume
Carassius auratus	7,4	225	27	1,50
Triton cristatus	7,7	2500	270	1,46
Rana esculenta	7,7	930	93	1,45
Bufo vulgaris	7,7	815	70	1,33
Lacerta viridis	7,7	290	33	1,40
Anser anser	7,7	130	8	0,80
Gallus domesticus	7,7	100	6	0,75
Mus musculus	7,7	51	2,6	0,60
Homo sapiens	7,9	80	2,5	0,41

Questi risultati sono riassunti nella Tabella I e permettono alcune considerazioni mentre per la discussione generale e per la letteratura si rimanda ai lavori originali.

Appare innanzi tutto quale sia l'influenza del nucleo sul tenore enzimatico del citoplasma. Gli eritrociti di Mammifero che con il differenziamento hanno perduto il nucleo presentano un contenuto in dipeptidasi nettamente inferiore agli eritrociti nucleati degli altri Vertebrati. Se si compara inoltre l'attività dipeptidasica del citoplasma degli eritroblasti di ratto albino con quella degli eritrociti della stessa specie si vede come la perdita del nucleo influisca in modo netto sul tenore in dipeptidasi della cellula (Fig. 2). Queste osservazioni confermano quanto visto nelle amebe sul controllo nucleare di questi enzimi a localizzazione citoplasmatica.

Inoltre la termoregolazione mostra la sua influenza sul contenuto in dipeptidasi degli eritrociti permettendo di differenziare, anche da un punto di vista enzimatico, gli eterotermi dagli omeotermi: negli eterotermi la quantità di enzima è maggiore che negli omeotermi.

Condizioni interessanti presentano gli Uccelli che realizzano, si può dire, una esperienza naturale che li rende partecipi di condizioni comuni ai Pesci, Anfibi e Rettili da una parte e ai Mammiferi dall'altra. Infatti per la morfologia degli eritrociti troviamo la presenza del nucleo caratteristica dei Vertebrati a loro inferiori mentre per i fenomeni fisiologici della termoregolazione partecipano delle qualità dei Mammiferi. Queste caratteristiche mostrano di avere una corrispondenza nel contenuto in dipeptidasi degli eritrociti che è quantitativamente intermedio: minore che nei Pesci, Anfibi e Rettili (influenza della termoregolazione) e maggiore che nei Mammiferi (influenza del nucleo).

Sullo stesso materiale siamo passati allo studio dell'RNA citoplasmatico (URBANI e SALVIDIO[1]) e si è visto che l'acido ribonucleico nelle specie esaminate è proporzionale al volume dei globuli rossi; ciò concorda con quanto è stato detto a proposito delle dipeptidasi. Negli eritrociti di Mammiferi l'RNA è nettamente inferiore, per unità di peso secco, a quello contenuto nel citoplasma dei globuli rossi degli altri Vertebrati (Tabella II). L'acido ribonucleico citoplasmatico mostra di essere sotto il controllo nucleare come hanno visto LINET e BRACHET[2] nelle amebe sperimentalmente anucleate. Anche in questo caso perciò vi è parallelismo di comportamento tra RNA e dipeptidasi, tenuto conto anche della localizzazione dell'RNA nei microsomi. Il metodo citochimico comparativo spostato dal campo zoologico ai problemi del differenziamento ha mostrato che negli eritroblasti di ratto albino il tenore in RNA citoplasmatico è nettamente superiore all'RNA degli eritrociti, cellule differenziate anucleate.

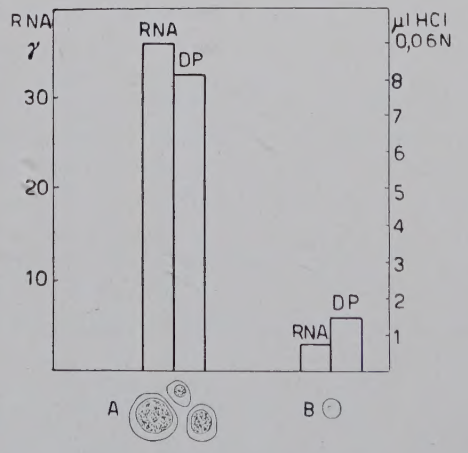


Fig. 2. Schema rappresentante l'attività dipeptidasica (*DP*) e il tenore in acido ribonucleico (*RNA*) del citoplasma di eritroblasti (*A*) ed eritrociti (*B*) di ratto albino.

Tabella II. – RNA Citoplasmatico negli eritrociti dei Vertebrati

Specie	Volume cellulare μ^3	γ RNA citopl. 10^6 eritrociti	γ RNA citopl. 1 mg peso secco
Pomotis gibbosus	75	1,0	21,5
Triton cristatus	2500	13,0	15,0
Rana esculenta	950	3,5	13,7
Bufo vulgaris	790	5,7	13,9
Lacerta muralis	293	2,6	23,0
Anser anser	115	0,7	20,6
Gallus domesticus	98	0,4	8,8
Cavia cobaya	75	0,11	2,8
Mus norvegicus	55	0,17	3,2
Homo sapiens	80	0,26	3,4

[1] E. URBANI e E. SALVIDIO, Haematologica *38*, 1 (1954).
[2] N. LINET e J. BRACHET, Biochim. biophys. Acta *7*, 607 (1951).

Queste osservazioni sugli eritroblasti e eritrociti confermano le ricerche spettrofotometriche di THORELL[1] che ha determinato quantità decrescenti di RNA citoplasmatico negli elementi della serie rossa durante il differenziamento. Questa diminuzione di RNA e di dipeptidasi accompagnata da una sintesi di emoglobina può lasciar pensare a relazioni tra dipeptidasi e RNA nella sintesi delle proteine.

Così anche KORITZ e CHANTRENNE[2] studiando l'incorporazione di glicina marcata nei reticolociti hanno visto che le dipeptidasi e l'RNA mostrano un eguale andamento.

L'influenza delle condizioni omeoterme e eteroterme non è chiaramente visibile per l'RNA come lo è per le dipeptidasi. Lo studio delle proteinasi non ha ancora dato risultati precisi in quanto presenta notevoli difficoltà per la presenza della emoglobina, probabilmente le stesse che hanno incontrato KORITZ e CHANTRENNE che hanno studiato anche le proteinasi ma non hanno rilevato attività enzimatica.

III. – *Organismi in vita latente.* Lo studio citochimico della vita latente presenta un grande interesse per i problemi di biologia generale che sono connessi con questo particolare stato biologico che fu definito da SPALLANZANI di «Vita minima». Gli organismi che hanno la possibilità di cadere in anabiosi resistono alle condizioni ambientali e sperimentali le più avverse, in quanto il protoplasma disidratato mostra di aver acquistato delle proprietà di eccezionale resistenza. Uno dei materiali sui quali questo problema può essere studiato è costuito dai germi incistati di *Artemia salina*. Questi embrioni, chiamati correntemente uova, sono protetti da una spessa cuticola e possono essere conservati a secco per molti anni. Quando vengono posti in acqua salata cominciano ad idratarsi e già dopo tre ore sono bene misurabili gli scambi respiratori (URBANI[3]); dopo circa 26 ore i naupli sono sgusciati e nuotano liberamente.

Lo studio enzimatico di queste cisti in vita latente ha dato interessanti risultati in quanto si è visto che posseggono una attività dipeptidasica (URBANI, ROGNONE e RUSSO[4]) proteinasica (URBANI e DE CESARIS COROMALDI[5]), amilasica (URBANI, RUSSO e ROGNONE[6]) fosfatasica (URBANI e URBANI MISTRUZZI[7]).

Il reperto mostra che questi enzimi devono essere legati al citoplasma disidratato in modo tale da non venire inattivati dalle molteplici avverse condizioni ambientali alle quali questi organismi vanno incontro durante l'anabiosi, che è durata, in uno dei casi studiati, circa quattordici anni.

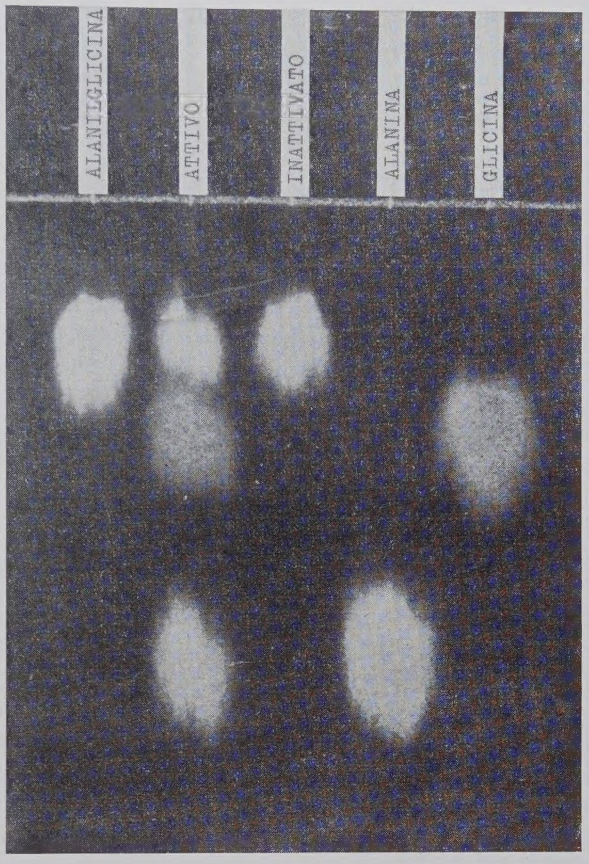


Fig. 3. Cromatografia della scissione enzimatica della alanilglicina da parte di un omogenato di germi incistati di *Artemia salina* L; lo stesso omogenato inattivato con l'ebollizione non idrolizza il dipeptide. Sullo stesso cromatogramma figurano come segno di repere le macchie della alanilglicina, della alanina e della glicina. (Propanolo 80, Acqua 20: rivelato con ninidrina.)

Quando i germi vengono omogenati con l'acqua, immediatamente gli enzimi (Fig. 3) sono in grado di idrolizzare l'alanilglicina o la caseina. Evidentemente ciò dimostra che nelle cisti restano conservati, sotto forma inattiva, dipeptidasi e proteinasi e la questione può essere prospettata come una sorta di *preformismo enzimatico* preparatorio alle condizioni di sviluppo.

Se poi volessimo considerare dipeptidasi e proteinasi esclusivamente come catepsine non si spiegherebbe il perchè della loro presenza nei germi incistati in quanto anche se queste uova perdono ad un certo momento la possibilità di «reviviscenza» non vanno mai incontro a fenomeni di autolisi. Dipeptidasi e proteinasi, come fosfatasi ed amilasi fanno perciò parte del corredo enzimatico del germe che entrerà in funzione non appena l'acqua idratando i colloidi cellulari permetterà l'instaurarsi dei fenomeni metabolici dell'embrione in sviluppo.

[1] B. THORELL, *Studies on the Formation of Cellular Substances During Blood Cell Production* (Edit. H. Kimpton, London 1947).

[2] S. KORITZ e H. CHANTRENNE, Biochim. biophys. Acta *13*, 209 (1954).

[3] E. URBANI, Boll. Soc. ital. Biol. Sper. *22*, 2 (1946).

[4] E. URBANI, L. ROGNONE e S. RUSSO, Rend. Acc. naz. Lincei *13*, 300 (1952).

[5] E. URBANI e L. DE CESARIS COROMALDI, Rend. Acc. naz. Lincei *14*, 144 (1953).

[6] E. URBANI, S. RUSSO e L. ROGNONE, Rend. Acc. naz. Lincei *14*, 697 (1953).

[7] E. URBANI e L. URBANI MISTRUZZI, Rend. Acc. naz. Lincei *15*, 126 (1953).

Tabella III. – Dipeptidasi negli oociti di *Rana esculenta*

Volume degli oociti in mm³	Attività enzimatica in µl HCl 0,06 N	Attività enzimatica / Volume
0,04	0,2	5,0
0,12	1,0	8,3
0,16	1,6	10,0
0,18	1,7	9,4
0,26	1,5	5,7
0,41	1,8	4,3
0,70	1,6	2,2
0,86	2,5	2,9
1,07	2,6	2,4
1,71	6,6	3,8

È noto in letteratura che questi enzimi possono essere messi in evidenza anche nei semi quiescenti (ENGEL e HEINS[1]) dove con l'inizio della germinazione probabilmente svolgono un ruolo analogo a quello che hanno nell'*Artemia salina*.

IV. – *Sviluppo embrionale e larvale degli Anfibi.* L'uovo vergine possiede un corredo enzimatico molto vario in quanto numerosi fermenti possono già essere messi in evidenza prima della fecondazione (NEEDHAM[2], BRACHET[3]). Non è quì il caso di parlare del metabolismo delle uova e come la respirazione possa essere un indice prezioso dei vari processi che si svolgono nell'uovo vergine e fecondato (STEFANELLI[4]).

Per quanto riguarda i fermenti proteolitici negli Invertebrati marini le osservazioni più importanti si debbono a LINDERSTRØM-LANG e HOLTER[5] che hanno riconosciuto l'alanilglicina dipeptidasi in diverse specie, localizzate nell'ooplasma e probabilmente assente nel nucleo.

Nel caso particolare dell'uovo degli Anfibi BRACHET[6] ha constatato che nella vescicola germinativa vi è una quantità di dipeptidasi facilmente misurabile e nei giovani oociti dove appena inizia la vitellogenesi vi è una quantità di enzima tre volte superiore, a parità di peso, a quella dei grandi oociti. Questi risultati sono stati ottenuti su *Rana fusca*. DUSPIVA[7] lavorando su *Rana esculenta* e su *Rana fusca* ha rilevato un elevato tenore in dipeptidasi al momento dell'inizio della vitellogenesi.

Il tenore in dipeptidasi dell'oocita in crescita è stato studiato anche nel nostro Istituto (DE CESARIS COROMALDI[8]) ed i risultati ottenuti, che confermano quelli di DUSPIVA, sono riassunti nella Tabella III.

[1] CHR. ENGEL e J. HEINS, Bioch. biophys. Acta *1*, 190 (1947).
[2] J. NEEDHAM, *Biochemistry and Morphogenesis* (Univ. Press, Cambridge 1942).
[3] J. BRACHET, *Embryologie Chimique* (Masson & Desoer, Paris 1947).
[4] A. STEFANELLI, *Fenomeni respiratori nella fecondazione e attivazione dell'uovo*, Simposio speciale dell'IUBS (1948).
[5] K. U. LINDERSTRØM-LANG, *Proteins and Enzymes*, Lane Medical Lect. (Standford University Press, 1952).
[6] J. BRACHET, *Embryologie Chimique* (Masson & Desoer, Paris 1947).
[7] F. DUSPIVA, Biol. Zbl. *62*, 403 (1942).
[8] L. DE CESARIS COROMALDI, osservazioni inedite.

Si noterà come il massimo tenore in dipeptidasi per unità di volume è nel periodo di accrescimento nel quale cominciano a comparire le prime formazioni vitelline. Il parallelismo tra comportamento delle dipeptidasi e dell'RNA citoplasmatico degli oociti in crescita di Anfibi (BRACHET[1], STEINERT[2]) è evidente. È noto infatti che negli oociti in crescita di molte specie animali il comportamento dell'RNA è di massima concentrazione nel periodo precedente la vitellogenesi e quando questa è appena iniziata (URBANI[3]). Questo fatto rende verosimile l'idea che dipeptidasi e acido ribonucleico intervengano nella sintesi del vitello.

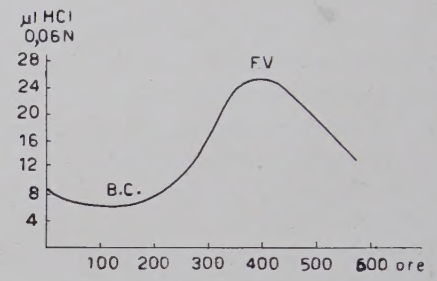


Fig. 4. Dipeptidasi nello sviluppo embrionale e larvale di *Bufo vulgaris*. In ordinate l'attività enzimatica, in ascisse le ore di sviluppo alla temperatura del laboratorio. B.C. = stadio di bottone caudale, F.V. = stadio di fine vitello. Si noti la caduta della attività dipeptidasica che si verifica con il passaggio alla vita larvale.

Nella fecondazione si ha, per quanto riguarda le dipeptidasi, un aumento rispetto all'uovo vergine sia in *Rana esculenta* (DE CESARIS COROMALDI[4]) che in *Bufo vulgaris* (URBANI e DE CESARIS COROMALDI[5])

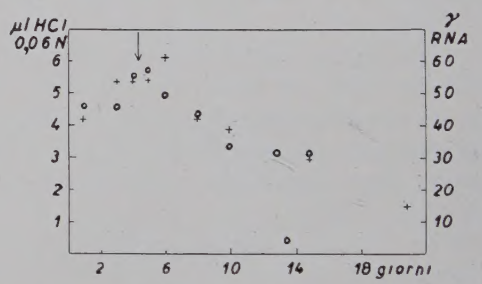


Fig. 5. Comportamento delle dipeptidasi (0) e dell'RNA (+) in embrioni e larve di *Bufo vulgaris*. In ascisse i giorni di sviluppo dall'inizio dei dosaggi. La freccia indica la fine del vitello. Si noti il parallelismo di comportamento tra dipeptidasi e RNA.

e questi dati trovano corrispondenza nello studio di LUNDBLAD[6] sulla attività proteinasica (substrato gelatina) di uova vergini e fecondate di *Paracentrotus* e di *Arbacia*. DOYLE[7] invece non ha riscontrato diffe-

[1] J. BRACHET, *Embryologie Chimique* (Masson & Desoer, Paris 1947).
[2] M. STEINERT, Bull. Soc. Chim. Biol. *33*, 549 (1951).
[3] E. URBANI, Riv. di Biologia *41*, 331 (1949); Rend. Acc. naz. Lincei *14*, 558 (1953).
[4] L. DE CESARIS COROMALDI, La Ricerca scient. *24*, 319 (1954).
[5] E. URBANI e L. DE CESARIS COROMALDI, Ric. Scient. *24*, 1275 (1954).
[6] G. LUNDBALD, Exp. Cell. Res. *1*, 264 (1950).
[7] W. L. DOYLE, C. R. Lab. Carlsberg, Sér. Chim. *21*, 291 (1938).

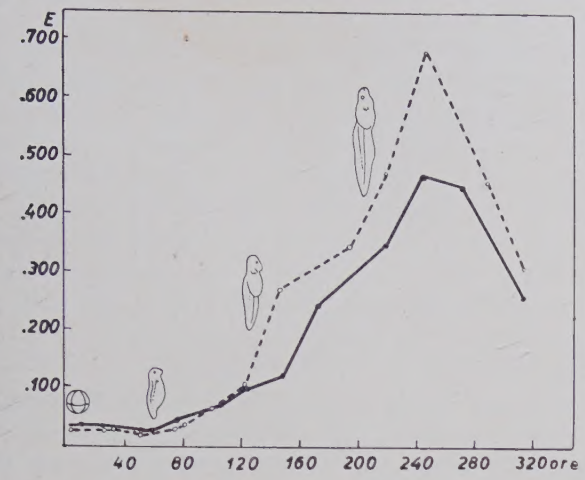


Fig. 6. Comportamento delle proteinasi durante lo sviluppo embrionale e larvale di *Rana esculenta*. Sono rappresentati nel grafico i dosaggi eseguiti su due diversi lotti di uova sviluppatisi a temperatura del laboratorio. In ascisse le ore di sviluppo, in ordinate l'attività enzimatica espressa in estinzioni. Con il passaggio alla vita larvale si ha anche per le proteinasi una caduta della attività enzimatica.

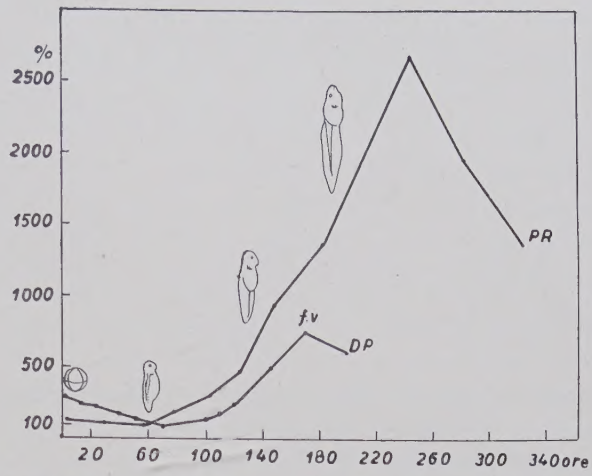


Fig. 7. Rappresentazione comparativa della attività dipeptidasica e proteinasica nello sviluppo embrionale e larvale di *Rana esculenta*. L'attività enzimatica minima riscontrata (stadio di bottone caudale–giovane pinna caudale) è stata posta sia per le dipeptidasi che per le proteinasi uguale a 100. Tutti gli altri valori sono stati riportati in per cento della attività enzimatica minima.

renze significative nella attività dipeptidasica di uova vergini e fecondate di *Psammechinus miliaris*. Rimane aperta perciò la questione se tutte le uova presentino modifiche della attività proteolitica con la fecondazione o se invece non accada qualcosa di analogo a quanto dimostrato da STEFANELLI[1] per la respirazione.

Sia in *Rana esculenta* che in *Bufo vulgaris* il tenore in dipeptidasi diminuisce dopo la fecondazione fino allo stadio di bottone caudale per poi aumentare fino alla fine del periodo embrionale (Fig. 4). COTRONEI[2] ha dimostrato che con la fine del vitello, si modificano le correlazioni umorali e metaboliche degli Anfibi ed è con il termine del riassorbimento del tuorlo che si ha il passaggio dalla vita embrionale alla vita larvale. Questo stadio critico dello sviluppo mostra un preciso comportamento delle dipeptidasi sia in *Rana* che in *Bufo*, infatti, con la fine del tuorlo, si ha una caduta del tenore enzimatico (Fig. 4 e 5).

Le dipeptidasi mostrano perciò una diminuzione dalla segmentazione al bottone caudale ed un aumento da questo stadio fino alla fine del vitello cioè con il periodo di forte accrescimento dell'embrione.

Mentre questa seconda fase appare spiegabile se si pensa che le dipeptidasi sono particolarmente abbondanti in tutti i tessuti ed organi in accrescimento e dove i poteri di sintesi sono elevati, rimane enigmatica la diminuzione fino allo stadio di bottone caudale. Queste osservazioni confermano anche quanto visto da LØVTRUP[3] nelle sue belle ricerche sulle dipeptidasi e tripeptidasi degli Urodeli ma la diminuzione dello stadio di fine vitello non è stata messa da questo Autore in relazione con il riassorbimento del tuorlo e con l'arresto dello sviluppo che si ha nelle giovani larve se queste non vengono alimentate.

Le proteinasi sono state per ora studiate solo in *Rana esculenta* (URBANI e DE CESARIS COROMALDI[1]) ed abbiamo potuto vedere che il loro andamento durante lo sviluppo embrionale e larvale è somigliante a quello delle dipeptidasi. Dalla segmentazione al bottone caudale si ha una diminuzione molto lieve delle proteinasi; dal bottone caudale alla fine del vitello un forte aumento e, con il passaggio alla vita larvale, una caduta del tenore in proteinasi (Fig. 6).

Se si pone uguale a 100 l'attività dipeptidasica e proteinasica allo stadio di bottone caudale si vede però che il comportamento quantitativo dei due enzimi varia in modo notevolmente diverso durante lo sviluppo. Allo stadio di fine vitello infatti le dipeptidasi sono aumentate del 763% e le proteinasi del 2703%, perciò durante l'accrescimento l'attività di queste due categorie di enzimi varia con diverso rapporto (Fig. 7).

Dipeptidasi e proteinasi di *Rana esculenta* sono anche diversamente sensibili alla inattivazione spontanea. Come è illustrato nella Tabella IV dove l'attività dipeptidasica e proteinasica di un omogenato di embrioni (bottone caudale) è stata posta per il tempo zero uguale a 100. Si vede come le dipeptidasi si inattivano molto più rapidamente delle proteinasi.

Dato che l'aumento degli enzimi proteolitici si verifica dallo stadio di bottone caudale abbiamo voluto studiare la loro distribuzione negli embrioni a questo stadio. Già alcuni autori si sono posti il quesito della localizzazione delle dipeptidasi nella gastrula degli

[1] A. STEFANELLI, *Fenomeni respiratori nella fecondazione e attivazione dell'uovo*, Simposio speciale dell'IUBS (1948).

[2] G. COTRONEI, Arch. Zool. ital. *10*, 85 (1922); Mon. Zool. ital. *41*, 8 (1930); Rend. Acc. naz. Lincei *6*, 15 (1932) e Note segg. sugli stessi Rendiconti.

[3] S. LØVTRUP, C. R. Lab. Carlsberg, Sér. Chim. *28*, 426 (1953).

[1] E. URBANI e L. DE CESARIS COROMALDI, La Ricerca Scient. *24*, 2364 (1954).

Tabella IV. – Inattivazione delle dipeptidasi e delle proteinasi nell'omogenato di embrioni di *Bufo vulgaris*.
L'attività enzimatica al tempo zero è stata posta uguale a 100

Tempo ore	Dipeptidasi	Proteinasi
0	100	100
5	25	77
24	6,2	62
31	—	60
72	—	40

Tabella V
Dipeptidasi nel pancreas di ratto albino espresse in μl HCl 0,06 N

Controlli	Ore dopo lo stimolo pilocarpinico				
	0,5	1	2	4	7
2,3	1,4	2,6	3,8	3,4	3,6
3,3	1,6	2,9	3,9	3,5	3,4
3,1	2,2	2,4	5,2	4,6	4,0
3,2	2,7	3,3	3,9	3,8	3,6
Media 2,9	1,9	2,8	4,2	3,8	3,6
% 100	65	96	144	131	124

Anfibi (PICKFORD[1], GREGG e LØVTRUP[2], BARTH e SZE[3]) ed hanno riconosciuto un gradiente animale vegetativo. Lo stadio di bottone caudale riveste invece un particolare interesse perchè è da questo momento in poi che si verifica il forte aumento degli enzimi proteolitici.

Embrioni di *Bufo vulgaris* e di *Rana esculenta* sono stati tagliati in tre parti, cefalica, intermedia e caudale, le parti stesse pesate con la bilancia a diavoletto di Cartesio per determinare il peso ridotto (RW) e poi usate per la determinazione delle dipeptidasi, proteinasi, acido ribonucleico, consumo di ossigeno (microrespirometro di BRACHET); i risultati ottenuti sono illustrati nella Figura 8 dove i valori desunti dai dosaggi (riportati a unità di peso) sono stati posti uguali a 100 per la parte intermedia. È evidente come in *Bufo vulgaris* le dipeptidasi siano più forti nella parte cefalica e caudale e così l'RNA che mostra parallelismo di comportamento con questi enzimi. Anche il consumo di O_2 è più elevato nella parte cefalica e caudale.

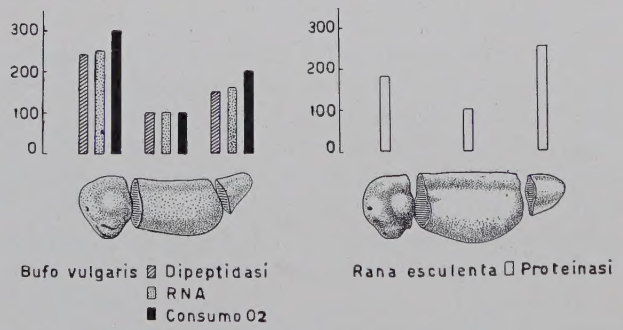


Fig. 8. Distribuzione delle dipeptidasi, RNA e consumo di O_2 nell'embrione di *Bufo vulgaris* allo stadio di bottone caudale e delle proteinasi nell'embrione di *Rana esculenta* allo stesso stadio. I valori trovati per il pezzo intermedio (divisi per il peso) sono stati posti uguali a 100 e quelli della parte cefalica e caudale (divisi per il peso) riportati in percento.

Le proteinasi, studiate per ora solo su *Rana esculenta*, mostrano analogo comportamento con la differenza di un massimo tenore nella parte caudale.

Da questi risultati appare evidente che gli enzimi proteolitici si trovano nella maggior concentrazione in quelle zone di maggiore attività morfogenetica e dove i processi di accrescimento sono più spiccati come nella parte cefalica e nel bottone caudale. La parte intermedia che è quella che ha la maggiore quantità di cellule vitelline mostra, per unità di peso, il minore tenore in dipeptidasi, proteinasi e RNA. Che le parti cefaliche e caudali siano quelle che hanno il più elevato metabolismo è documentato dalle determinazioni del consumo di O_2.

Questo studio sugli embrioni di Anfibi ha suggerito varie considerazioni per le quali rimando ai lavori originali, limitandomi qui a rilevare che, mentre rimane enigmatico il comportamento degli enzimi proteolitici dalla segmentazione al bottone caudale, il forte aumento da questo stadio in poi può essere interpretato come un espressione delle continuamente aumentanti esigenze metaboliche dell'embrione nei processi di morfogenesi e di accrescimento: i risultati ottenuti perciò non contrastano con l'idea che questi enzimi intervengano nei fenomeni di sintesi.

V. – *Rigenerazioni.* I blastemi rigenerativi sono stati studiati, nei riguardi del tenore in enzimi proteolitici, da ORECHKOVITCH[1] che ha visto che nella coda in rigenerazione di larve di *Rana* e di *Axolotl* l'attività dipeptidasica aumenta fino al 10–12° giorno di rigenerazione. Le proteinasi (substrato, gelatina) aumentano pure ma con un ritmo diverso in quanto raggiungono il massimo dopo 3–4 giorni. Questa differenza di comportamento tra dipeptidasi e proteinasi, già notata nei frammenti nucleati e anucleati di ameba e nello sviluppo embrionale degli Anfibi, è una prova delle diverse funzioni assolte dalle dipeptidasi e dalle proteinasi nel metabolismo cellulare (cfr. NEEDHAM[2]).

Nel nostro Istituto P. SETTE[3] ha ripreso lo studio delle dipeptidasi nella rigenerazione della coda e della zampa di *Triton cristatus* e i risultati ottenuti sono schematizzati nella Figura 9 dove l'attività enzima-

[1] G. PICKFORD, J. Exp. Zool. *92*, 143 (1943).
[2] J. R. GREGG e S. LØVTRUP, C. r. Lab. Carlsberg, Sér. Chim. *27*, 307 (1950).
[3] L. G. BARTH e L. C. SZE, Physiol. Zool. *26*, 205 (1953).

[1] V. N. ORECHKOVITCH, Bioch. Z. *286*, 91 (1936) e citato in J. NEEDHAM.
[2] J. NEEDHAM, *Biochemistry and Morphogenesis* (Univ. Press, Cambridge 1942).
[3] Osservazioni inedite.

tica della coda e zampa normali è posta eguale a 100 e quella dei blastemi di rigenerazione è riportata in per cento della attività normale. È noto che l'RNA è elevato nei blastemi di rigenerazione (CLEMENT-NOËL[1]) ed anche in questo caso vi è forse un parallelismo di comportamento tra RNA e dipeptidasi. L'argomento merita di essere indagato con dosaggi contemporaneamente condotti dell'acido ribonucleico delle dipeptidasi e delle proteinasi anche perchè nei blastemi di rigenerazione è molto probabile che vi siano fenomeni di autolisi e quindi una vera e propria attività di catepsine. I risultati ottenuti finora mostrano però indubbiamente l'esistenza di relazioni tra il tenore in enzimi proteolitici del blastema e la sintesi di nuova sostanza vivente che si realizza nei processi rigenerativi.

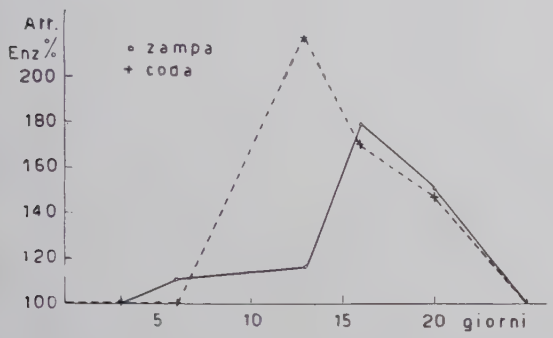


Fig. 9. Attività dipeptidasica del blastemo rigenerativo della zampa e della coda di *Triton cristatus* a vari giorni (ascisse) dalla amputazione. L'attività enzimatica dei controlli è stata posta eguale a 100 e quella dei tessuti in rigenerazione riportata in per cento.

Lo studio enzimatico dei fenomeni rigenerativi riveste un grande interesse, non solo per il problema particolare ma anche per le considerazioni generali che derivano dal confronto con i risultati che si ottengono sul materiale embrionale.

In ambedue i casi infatti si realizza l'attuazione di «potenze» e i potenziali morfogenetici dell'embrione e dell'organismo in rigenerazione hanno certamente il loro fondamento biochimico nel tenore enzimatico. Queste ricerche meritano perciò di essere estese alle rigenerazioni nelle larve degli Anuri e degli Urodeli allo scopo di chiarire il ruolo degli enzimi proteolitici nel complesso quadro dei problemi regolativi.

VI. – *Cellule ghiandolari.* VAN WEEL[2] ha studiato il comportamento della glicil-glicina dipeptidasi nel pancreas di ratto dopo stimolazione pilocarpina ed ha visto che il ciclo di lavoro della ghiandola esocrina è accompagnato da un tipico comportamento delle dipeptidasi. Quando i granuli di secreto sono espulsi dalla cellula a seguito dello stimolo pilocarpino le dipeptidasi diminuiscono e poi cominciano ad aumentare di nuovo con la sintesi del secreto.

[1] H. CLEMENT-NOËL, Ann. Soc. roy. Zool. Belgique *286*, 91 (1936).
[2] H. VAN WEEL, Z. Zellforsch. *27*, 65 (1939).

URBANI MISTRUZZI e VECCHIOLI[1] hanno ripreso queste osservazioni ed alcuni risultati da loro ottenuti su pancreas di ratto albino sono riportati nella Tabella dove l'attività dipeptidasica è espressa in μl HCl 0,06 N.

C'è una certa corrispondenza tra il ciclo delle dipeptidasi e il ciclo dell'RNA nella stessa ghiandola dopo stimolazione pilocarpinica (URBANI MISTRUZZI e PACINI[2]) e queste osservazioni meritano di essere completate con lo studio degli acidi nucleici condotto quantitativamente, cosa che in parte è stata fatta da CAPPELLETTI[1] e che conferma i risultati istochimici di URBANI MISTRUZZI e PACINI. Mancano dati sulle proteinasi che invece è desiderabile avere per integrare il quadro enzimatico della attività secretoria. Altra questione che bisogna tener presente degli studi sul pancreas è che il secreto della parte acinosa è un secreto enzimatico e perciò i risultati vanno diversamente interpretati da quelli ottenuti in altre cellule nelle quali gli enzimi studiati sono esclusivamente intracellulari.

Conclusioni

La presente rassegna ha lo scopo di inquadrare una serie di risultati ottenuti da me e dai miei Collaboratori, sugli enzimi proteolitici studiati nei materiali biologici più diversi.

Si è detto nella introduzione che i compiti che svolgono gli enzimi proteolitici intracellulari non sono chiari in quanto possono essere le loro attività diversamente interpretate.

L'idea che essi abbiano un ruolo postmortale nella cellula provvedendo alla autolisi del protoplasma rispecchia solo un lato della questione in quanto essi probabilmente intervengono direttamente nei processi metabolici.

La loro ubiquità, il fatto che essi siano presenti in tutti i tessuti in accrescimento (ci si riferisce particolarmente alla dipeptidasi), hanno fatto pensare che essi intervengano nella sintesi delle proteine e questo è un dato attendibile anche per le relazioni che sembrano esservi tra dipeptidasi e acidi nucleici.

Dipeptidasi e proteinasi, le prime idrolizzanti composti a basso peso molecolare, le seconde composti ad elevato peso molecolare mostrano oltre che questa differenza nell'attacco dei substrati anche differente localizzazione cellulare e differente comportamento nelle condizioni fisiologiche e sperimentali.

Nelle amebe le dipeptidasi sarebbero localizzate, secondo HOLTER e Coll. nei microsomi o nel citoplasma ialino, o in ambedue; le proteinasi come le amilasi ed altri enzimi nei mitocondri.

Le prime si trovano sotto il controllo nucleare, se non esclusivamente almeno in gran parte, mentre le seconde non mostrano di essere turbate dall'asportazione del nucleo.

[1] Osservazioni inedite.
[2] L. URBANI MISTRUZZI e V. PACINI, Rend. Acc. naz. Lincei *10*, 427 (1951).

Negli eritrociti nucleati e anucleati e negli eritroblasti si ritrova questa dipendenza delle dipeptidasi e dell'RNA dal nucleo cellulare.

Negli oociti in crescita le dipeptidasi mostrano, al pari dell'RNA strette relazioni con la sintesi del vitello. Nello sviluppo embrionale degli Anfibi sia le dipeptidasi che le proteinasi sono maggiormente concentrate nelle zone di morfogenesi e di accrescimento e sembrano collegate con la crescente attività metabolica dell'embrione in sviluppo. Dipeptidasi e proteinasi mostrano anche negli Anfibi differenti caratteristiche indicatrici di un diverso ruolo nello sviluppo.

Negli organismi in vita latente le osservazioni hanno mostrato che le cisti di *Artemia salina* conservano, come per un preformismo enzimatico dipeptidasi e proteinasi al pari di altri enzimi; questo è un fatto che sembra escludere il significato di catepsine di questi fermenti proteolitici.

Nelle rigenerazioni le dipeptidasi e le proteinasi hanno un diverso comportamento e sopratutto le prime sembrano collegate con i processi di sintesi che si realizzano nei blastemi rigenerativi.

Anche in questo caso si può porre il problema di un preformismo o di una epigenesi enzimatica. Può essere cioè che nel blastema rigenerativo si abbia una «attivazione» di enzimi già esistenti nella cellula oppure una neo-formazione: in questo secondo caso si può pensare al richiamo da altre parti dell'organismo dei materiali necessari alla sintesi della molecola enzimatica.

Mentre nelle uova di *Artemia* i risultati ottenuti mostrano chiaramente che si tratta di una riserva enzimatica, nelle rigenerazioni rimane da decidere in quale misura ciascuno di questi due meccanismi contribuisca all'aumento della attività proteolitica.

Nelle cellule ghiandolari le dipeptidasi mostrano di intervenire nei fenomeni di sintesi del secreto.

In conclusione lo studio dei più differenti materiali biologici e l'indirizzo comparativo e zoologico che ha guidato le presenti ricerche mostrano di essere una metodica promettente per lo studio della funzione degli enzimi proteolitici nella cellula e nell'embrione.

Zusammenfassung

Die Rolle der intrazellulären proteolytischen Enzyme ist nicht eindeutig abgeklärt, insofern ihre Wirkung verschieden interpretiert werden kann. Die Ansicht, dass sie die Lyse des Protoplasmas nach dem Tode der Zelle bewirken (Kathepsine), berührt nur eine Seite des Problems, da sie wahrscheinlich direkt in die Stoffwechselprozesse eingreifen.

Die Tatsache, dass sie in allen wachsenden Geweben und in Zellen mit hohem synthetischem Vermögen vorkommen, lässt vermuten, dass sie am Aufbau der Proteine beteiligt sind. Die Beziehungen zwischen proteolytischen Enzymen und Pentosenukleinsäuren sind somit von grossem Interesse. Die Dipeptidasen, welche Verbindungen mit niedrigen, und die Proteinasen, welche solche mit hohem Molekulargewicht hydrolysieren, sind in der Zelle verschieden lokalisiert und unterscheiden sich ausserdem in ihrem Verhalten unter physiologischen und experimentellen Bedingungen.

Bei den Amöben stehen die Dipeptidasen unter partieller Kernkontrolle, während die Proteinasen vom Kern nicht beeinflusst werden. Auch in den Erythrozyten der Wirbeltiere und in den Erythroblasten der Säuger findet man diese Kernabhängigkeit der im Cytoplasma lokalisierten Dipeptidasen, und bekanntlich wird die RNS des Cytoplasmas ebenfalls vom Kern kontrolliert.

In wachsenden Oocyten bestehen enge Beziehungen zwischen Dipeptidasen, RNS und Dottersynthese.

Bei der embryonalen und larvalen Entwicklung der Amphibien sind sowohl Dipeptidasen wie Proteinasen in den Zonen von Morphogenese und Wachstum stärker konzentriert und scheinen mit der zunehmenden Stoffwechseltätigkeit des Embryos in Verbindung zu stehen.

In Organismen im latenten Lebenszustand bleiben Dipeptidasen und Proteinasen durch eine enzymatische Präformation erhalten.

Das Problem von Präformation und enzymatischer Epigenese stellt sich neuerdings bei den Erscheinungen der Regeneration, wo die proteolytischen Enzyme in ganz bestimmter Weise beteiligt sind.

In den Drüsenzellen greifen sowohl Dipeptidasen wie RNS in die Sekretsynthese ein.

Das reichhaltige, unter normalen und experimentellen Bedingungen geprüfte Material und die vergleichende Methode, nach welcher die vorliegenden Untersuchungen durchgeführt wurden, ergaben vielversprechende Resultate für das Studium der Funktion der proteolytischen Enzyme in Zelle und Embryo.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Steroids. LXVI[1]. Microbiological Hydroxylation of Steroids in Position 21

Following the discovery by PETERSON *et al.*[2] of the transformation of progesterone into 11α-hydroxy-progesterone by molds of the Mucorales family, a number of hydroxylations of steroids by microorganisms have been reported. The introduction of the hydroxy group into position 6β[3], 7β[4], 8ξ[5], 11α[6], 11β[7], 14α[8], 15ξ[9], 16α[10], and 17α[11], has been described.

The recent publication by MEYSTRE, VISCHER, and WETTSTEIN[12] describing the hydroxylation of steroids in position 21 by fungi of the Ophiobolus family has prompted us to report on our own independent work on the introduction of the hydroxy group into position 21, by *Aspergillus niger* ATCC 9142. Progesterone was incubated with a 48 h growth of Aspergillus niger ATCC 9142 on a peptone-molasses medium for 96 to 144 h; extraction of the fermentation liquor with chloroform and chromatography on silica gel yielded desoxycorticosterone, identified by its physical constants (m.p. 142–143°, $[\alpha]^{20}D$ + 185° (ethanol) and by its infrared spectrum.

Fermentation of the following steroid substrates with Aspergillus niger ATCC 9142 gave the corresponding 21-hydroxy derivatives:

Substrates	*Conversion Products*
19-nor-progesterone	19-nor-desoxycorticosterone
11-keto-progesterone	11-dehydrocorticosterone
11α-hydroxy-progesterone	11-epicorticosterone
11β-hydroxy-progesterone	corticosterone
6β-hydroxy-progesterone	6β-hydroxy-desoxycorticosterone
14α-hydroxy-progesterone	14α-hydroxy-desoxycorticosterone

In all cases, paper chromatography indicated the presence of more polar compounds in addition to the conversion products. The characterization of the oxidation products was based on comparison of chromatographic behavior[1], sulfuric acid chromogen curve[2], melting point, optical rotation and infrared spectra with those of the known compounds.

A. ZAFFARONI, C. CASAS CAMPILLO, F. CORDOBA, and G. ROSENKRANZ

Research Laboratories, Syntex S. A., Mexico D. F., February 8, 1955.

Zusammenfassung

Die Einführung einer Hydroxylgruppe in die 21-Stellung gewisser Pregnanderivate mittels *Aspergillus niger* ATCC 9142 wird beschrieben.

[1] A. ZAFFARONI, Recent Progr. Hormone Res. *8*, 51 (1953).

[2] A. ZAFFARONI, Recent Progr. Hormone Res. *8*, 51 (1953); J. Amer. Chem. Soc. *72*, 3828 (1950).

[1] Paper LXV, J. IRIARTE, G. ROSENKRANZ, and F. SONDHEIMER, J. Org. Chem. (in press).

[2] D. H. PETERSON and H. C. MURRAY, J. Am. Chem. Soc. *74*, 1871 (1952).

[3] S. H. EPPSTEIN *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 408 (1953). – H. C. MURRAY and D. H. PETERSON, U. S. Pat. 2,602,769 (July 8, 1952).

[4] H. C. MURRAY and D. H. PETERSON, U. S. Pat. 2,602,769 (July 8, 1952). – F. W. KAHNT *et al.*, Experientia *8*, 422 (1952).

[5] H. C. MURRAY and D. H. PETERSON, U. S. Pat. 2,602,769 (July 8, 1952).

[6] D. H. PETERSON and H. C. MURRAY, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 1871 (1952). – S. H. EPPSTEIN *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 408 (1953). – H. C. MURRAY and D. H. PETERSON, U. S. Pat. 2,602,769 (July 8, 1952). – D. H. PETERSON *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 5933 (1952). – P. D. MEISTER *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 55 (1953). – J. FRIED *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 3962 (1952). – O. MANCERA *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 3711 (1952).

[7] D. R. COLINGSWORTH *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 2381 (1952). – F. R. HANSON *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 5369 (1953). – G. M. SHULL *et al.*, U. S. Pat. 2,658,023 (Nov. 3, 1953).

[8] P. D. MEISTER *et al.*, Abstr. 123rd Meet. Amer. Chem. Soc., Los Angeles, Calif., March 15–19 (1953), p. 5C.

[9] J. FRIED *et al.*, Recent Progr. Hormone Res. *10* (in press).

[10] D. PERLMAN *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 2126 (1952). – E. VISCHER *et al.*, Helv. chim. Acta *37*, 321 (1954).

[11] P. D. MEISTER *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. *76*, 4050 (1954). – C. MEYSTRE *et al.*, Helv. chim. Acta *37*, 1548 (1954).

[12] C. MEYSTRE *et al.*, Helv. chim. Acta *37*, 1548 (1954).

Studies on the Action of X-Rays on Aqueous Solutions of Nucleic Acids and Some Nucleotides

It has been known for some time that the action of ionising radiations on desoxyribonucleic acid (D.N.A.) solutions leads to a loss of viscosity[1]. The significance of the slow post-irradiation viscosity loss ("after effect") noted by several workers[2], has been investigated in detail by BUTLER and CONWAY[3]. These authors concluded that it occurred only if oxygen was present during irradiation and suggested that it may be due to oxidative processes involving hydrogen peroxide and to the slow decomposition of primarily formed hydroperoxides.

We have suggested[4] that chemical reactions of the free radicals produced by the action of the radiation[5] can

[1] A. H. SPARROW and F. M. ROSENFELD, Science *104*, 245 (1946). – B. TAYLOR, J. P. GREENSTEIN, and A. HOLLAENDER, Arch. Biochem. *16*, 19 (1948). – G. C. BUTLER, Can. J. Research. *B 27*, 972 (1949). – D. B. SMITH and G. C. BUTLER, J. Amer. Chem. Soc. *73*, 258 (1951). – G. LIMPEROS and W. A. MOSHER, Amer. J. Roentgenol. Radium Therapy *63*, 681 (1950).

[2] B. TAYLOR, J. P. GREENSTEIN, and A. HOLLANDER, Arch. Biochem *16*, 19 (1948). – G. C. BUTLER, Can. J. Research. *B 27*, 972 (1949). – G. LIMPEROS and W. A. MOSHER, Amer. J. Roentgenol. Radium Therapy *63*, 681 (1950).

[3] J. A. V. BUTLER and B. E. CONWAY, J. Chem. Soc. *1950*, 3418; *1952*, 834.

[4] G. SCHOLES and J. WEISS, Nature *171*, 920 (1953).

[5] J. WEISS, Nature *153*, 748 (1944); Brit. J. Radiol. Suppl. *1*, 56 (1947).

Change of viscosity of 0·1% (w/v) aqueous solutions of D.N.A. (thymus) after irradiation with X-rays (200 kV). Total dose 7,100 rep (dose rate 1185 rep/min; $G(Fe^{3+}) = 15{\cdot}6 \pm 0{\cdot}8$).

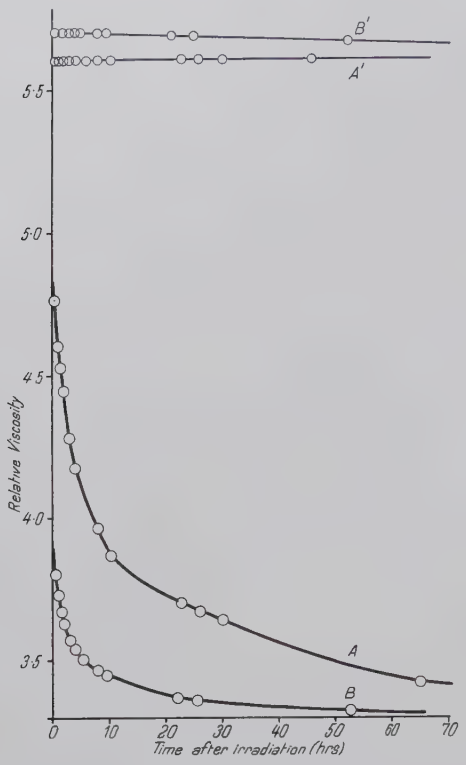


Fig. 1.–Curve *A*. Irradiation in the presence at atmospheric oxygen Curve *B*. Irradiation *in vacuo*. *A'* and *B'* refer to the corresponding unirradiated controls.

Fig. 2.–In solutions made 0·1 M with respect to sodium chloride after irradiation. Curve *C*. Irradiation in the presence of atmospheric oxygen. Curve *D*. Irradiation *in vacuo*. *E* is the unirradiated control.

lead to the labilisation of carbon-phosphate linkages (i.e. intermediate formation of labile phosphate esters) which subsequently may undergo slow hydrolytic cleavage giving rise to (i) a post-irradiation viscosity loss in D.N.A. solutions and (ii) in the case of nucleotides and other phosphomonoesters, post-irradiation release of inorganic phosphate.

We wish now to report the results of some further investigations on the action of X-rays (200 kV) on aqueous solutions of nucleic acids and some nucleotides, which lend further support to the latter interpretation.

The viscosity changes in D.N.A. solutions on irradiation have been studied under a variety of conditions, with special reference to the effects of oxygen present during irradiation, and also when excess neutral salt was added after irradiation. Figs. 1*B* and 2[1] give some representative results obtained from five samples of D.N.A., equilibrated solutions (0·1% w/v) of which were irradiated with a dose of approximately 7,000 rep. All viscosity measurements were carried out at 25°C.

These graphs show the presence of a considerable after-effect in D.N.A. solutions, when irradiation is carried out in the presence of oxygen.

In oxygen-free solutions no after-effect is observed when the viscosity measurements are made in the presence of sodium chloride (0·1 M).

It must be concluded, therefore, on the basis of current views on the effects of neutral salts on polyelectrolytes[1], that the after-effect *in vacuo* is not due to a change in the structure of the molecules but to a slow re-equilibration of the D.N.A. particles consequent upon irradiation; this may be attributed to an association occurring when insufficient electrolyte is present to complete the counter-ion atmosphere of the D.N.A. particles[2]. These results have since been confirmed by Conway[3].

Another feature is that the total percentage loss of viscosity, for any one sample, is the same in the presence or absence of oxygen; this is independent of the presence of sodium chloride, when added after irradiation. However, the initial loss of viscosity on irradiation is less when oxygen is present. The total loss of viscosity for all the samples investigated is a linear function of the initial viscosity i.e. the percentage loss at constant dose is the same for all samples.

Freeze-dry experiments have shown that the extent of the after-effect is independent of any hydrogen peroxide produced in the solution by irradiation. In all cases the viscosity after-effect can be satisfactorily represented by the relationship:

$$\frac{1}{\zeta_t - \zeta_\infty} - \frac{1}{\zeta_0 - \zeta_\infty} = k\,t \qquad (1)$$

[1] In a similar graph which was published previously [M. Daniels, G. Scholes, and J. Weiss, Nature *171*, 1153 (1953)], there is a misprint in the time axis corresponding to a displacement of the time scale by 1 unit (= 2½ h) which is hereby corrected.

[1] Cf. P. Doty and G. Ehrlich, Ann. Rev. Phys. Chem. *3*, 81 (1952); J. Polymer. Sci. *12*, 159 (1954).

[2] F. T. Wall, J. R. Huizenga, and P. F. Grieger, J. Am. Chem. Soc. *72*, 2636, 9228 (1950).

[3] B. E. Conway, Brit. J. Radiol. *27*, 49 (1954).

[where ζ_0, ζ_t, ζ_∞ are respectively the relative viscosities immediately after irradiation ($t = 0$), at time t and infinity] thus allowing the evaluation of the initial loss and the experimental rate constant governing the decay.

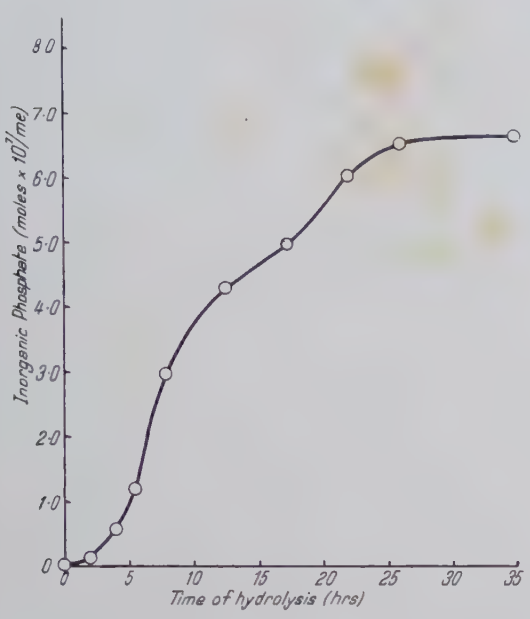


Fig. 3.–Irradiation of aqueous solutions of D.N.A. (0·1% w/v) with X-rays (200 kV) in the presence of oxygen (1 atm). Release of inorganic phosphate on hydrolysis (90°C; pH 6·8). Total dose = $3{\cdot}56 \times 10^4$ rep.

All these observations are not inconsistent with the assumption that irradiation in the presence of oxygen leads in part to a random labilisation of certain bonds in the polynucleotide chain (e.g. carbon-phosphate linkages) which may then undergo slow hydrolytic cleavage resulting in a post-irradiation viscosity loss. In the absence of oxygen, however, it appears that only immediate fracture of the chain takes place, this manifesting itself in the high initial viscosity loss.

In order to obtain some further insight into the chemical nature of the after effect, investigations have been carried out on aqueous solutions of some ribonucleotides. In particular, it has been found that, in addition to formation of inorganic phosphate on irradiation, hydrolysis at 25°C leads to the production of further amounts of phosphate at a measurable rate. This hydrolysis, which can be attributed to the formation of labile phosphate compounds during irradiation, was found to be of first order over the whole range of pH (0·5–13·0) and also exhibited a characteristic variation with pH. The rate and the extent of phosphate release was unaffected after freeze-drying. Hence, here again it is apparent that this process does not involve secondary oxidations by hydrogen peroxide. The pH-variation of the rate constant of the hydrolysis reaction suggests that the lability of the nucleotide is probably due to the formation of an activating carbonyl group in the sugar component[1]. When the irradiations were carried out in the absence of oxygen, some labile phosphates were still formed, though to a smaller extent; the rate constant of the hydrolysis was identical with that found in the oxygenated solutions.

[1] A. Desjobert, Thesis (Paris 1951); Bull. Soc. Chim. *111*, 809 (1947). – D. E. Koshland, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 2286 (1952).

Similar experiments with D.N.A. and also with ribonucleic acid solutions have also shown some interesting features. Very little post-irradiation phosphate release could be observed at 25°C; this result is not unexpected since chain fission, following oxidative attack on a sugar component which is initially diesterified, would involve the formation of a phospho-monoester, except when attack occurs at an end group. On hydrolysis at 90°C, however, the yield of phosphate release from nucleic acids was increased to many times the initial value; this hydrolysis was acid and base-catalysed and exhibited a complex kinetic behaviour. A typical hydrolysis curve for an irradiated D.N.A. solution is shown in Fig. 3.

These observations demonstrate clearly the presence of labile phosphate bonds in irradiated solutions of nucleic acids.

A full report of this work is in course of preparation.

We are indebted to Professor R. Signer (Berne) for samples of D.N.A. Our thanks are due to the Northern Council of the British Empire Cancer Campaign and to the Rockefeller Foundation for financial support.

M. Daniels, G. Scholes, and J. Weiss

University of Durham, King's College, Newcastle-upon-Tyne, 1, February 28, 1955.

Zusammenfassung

Die Wirkung von Röntgenstrahlen (200 kV) auf wässerige Lösungen von Nukleinsäuren und Nukleotiden wurde unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses von molekularem Sauerstoff und Wasserstoffsuperoxyd untersucht. Der so gefundene, nach der Bestrahlung einsetzende Abfall der Viskosität von D.N.A.-Lösungen (after-effect) kann als Hydrolyse der durch die Bestrahlung labilisierten Kohlenstoff-Phosphat-Bindungen angesehen werden. Untersuchungen über die Hydrolyse von bestrahlten Nukleotiden, -P.N.A.- und D.N.A.-Lösungen stehen in vollem Einklang mit obiger Annahme.

Living Smears from Endosperm

Studies on the endosperm *in vivo*[1] show clearly that it is excellent material for experimental researches on mitosis in the living cell.

The advantages of endosperm in comparison with other plant material are great: the course of mitosis is much better visible than in other tissues, the lack of cellulose walls allows not only better penetration of chemical substances, but also polarization and micrurgical studies. It seems probable that it may be used as a modification of the *Allium* test *in vivo*. Among genera studied so far: *Iris, Leucojum, Haemanthus, Clivia* and *Colchicum* appeared to be the best, although *Ornithogalum, Zephyranthes, Helianthus* and *Daphne* genera are also very suitable. A longer list with some methodical notes is given elsewhere[2]. It is evident that the endosperm of some species appeared to be much better than that of others, e.g. *Allium cepa, Vicia faba* and *Secale cereale* are not suitable at all. However, hundreds of plants are excellent–so that the material with the exact properties required so far as chromosome dimensions,

[1] A. Bajer, Acta Soc. Bot. Poloniae *22*, 267 (1953). – A. Bajer and J. Molè-Bajer, Acta Soc. Bot. Poloniae *23*, 69 (1954). – A. Bajer, Acta Soc. Bot. Poloniae *23*, 383 (1954).

[2] A. Bajer and J. Molè-Bajer, Acta Soc. Bot. Poloniae *23*, 69 (1954).

their number, duration of mitosis, etc., are concerned, may be chosen.

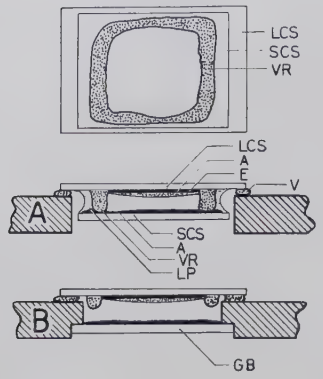


Fig. 1*A*.–Cross section of two cover slips and the holder and *B* of the chamber for observations of endosperm *in vivo*. Above *A* the top view of cover-slips with the pressed out endosperm. *VR* vaseline ring, *LCS* large cover slip (24 × 32 mm), *SCS* small cover slip (24 × 24 mm), *A* layers of agar, *LG* liquid paraffin (instead of liquid paraffin hot vaseline may be used), *E* endosperm with different quantity of liquid surrounding it, *H* metal holder to which cover slips are fixed with the vaseline *VGB* glass bottom. N.B.: *A* and *E* (agar and endosperm layers) are not drawn to scale. Actually they are much thinner.

The great value of endosperm is in the method of handling it, which is simple and quick. 3–6 weeks after pollination, according to the species, the endosperm is in a suitable stage of development, and, if the plant material is properly cultivated, may be available for several months in the year e.g. *Clivia* and *Haemanthus*. The preparation is made in the following way: on a large clean cover slip a 1–2 mm thick vaseline rectangle or ring of about 2 cm diameter is made and then the area inside the ring is smeared with hot agar with the proper sugar concentration. The endosperm is then pressed out with a small quantity of liquid surrounding it onto the agar to form a thin hanging drop and the whole is covered with the second cover slip also smeared with agar. The only reason for the agar on the second cover slip is to prevent the evaporation of the liquid surrounding the endosperm. The edges of the two cover slips are sealed with the hot vaseline or liquid paraffine (Fig. 1). If an inverted microscope is not used, the whole preparation is inverted and mounted on a suitably cut metal holder, 2–3 mm thick. The largest microscope magnifications may be used without difficulty. Agar 0·4–0·5 % and glucose 3–4·5 %, depending on the species, is suitable. The differences of 0·5 % glucose concentration are important, and the suitable one is found experimentally. If the hanging drop is very thin the endosperm begins to flatten and the degree of this process depends on the amount of the pressed-out endosperm. Living cells and mitotic spindles may be flattened almost to chromosome thickness, and, although they look like smears, this does not check the continuation process of the cell division (Fig. 2). It is evident that too severe flattening leads to disturbances and to death. The longer the process of mitosis, the slower should be the process of flattening, i.e. it should last 1–4 h depending on the species.

The same results as in the above-described two cover slip method are obtained if a special chamber with a glass bottom is used (Fig. 1). Oxygen atmosphere used previously[1] seems to be unnecessary. Some observations suggest, however, that oxygen as well as light may influence the mitosis in endosperm, especially the prophase, e.g. strong light stops the prophases of *Haemanthus* and usually all stages of *Crambe*. Probably there is also a correlation between light and oxygen. The above-mentioned difficulties, however, arose only in a few subjects. This method gives good results for most of the species investigated so far. The method, which has been improved during the last few years, suggests optimistic prospects. A short time ago, the author wrote[1]: "...the main defect of Haemanthus endosperm is that the normal course of mitosis can be observed only for a short time (usually 6 h) after preparation—and most cells die in prophase." Now cells entering and finishing the normal course of mitosis more than 60 h after preparation have been observed and most probably this time would be longer if sterile conditions could be attained. The author is deeply convinced that further improvement of this method is possible, even to a point where cell tissue cultures having the properties of animal tissue culture, i.e. creeping and growing in one layer, will be obtained from endosperm.

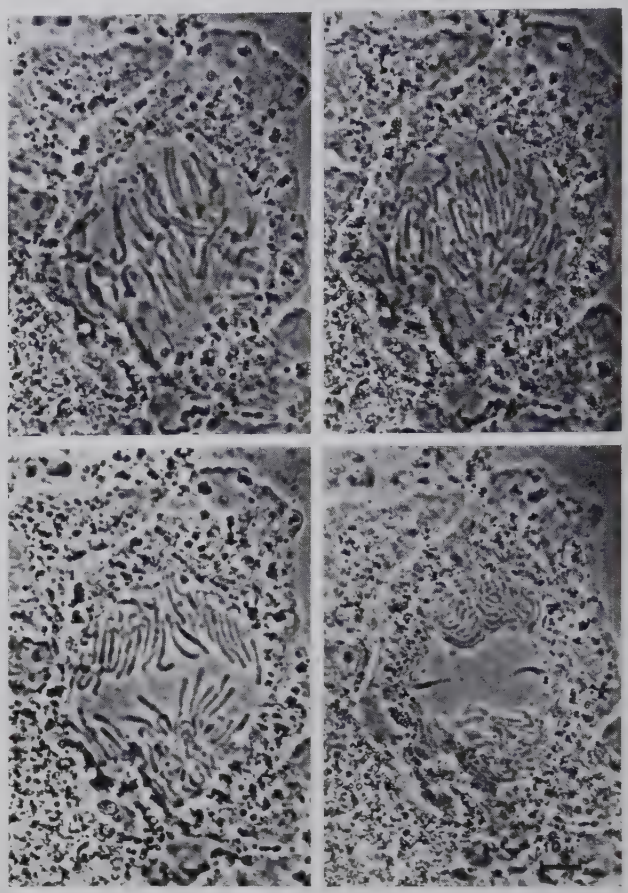


Fig. 2.–Anaphase in flattened cell of *Leucojum aestivum*. Chromosomes are arranged almost in one layer. Phase contrast illumination.

A. Bajer

Laboratory of Plant Physiology, Jagellonian University, 53, Grodzka, Cracow, Poland, February 26, 1955.

Zusammenfassung

Eine einfache Methode wird beschrieben, welche die Beobachtung der Endospermmitose *in vivo* erlaubt. Dabei ist es möglich, lebende Mitosespindeln stark abzuplatten und so den weiteren Ablauf des Teilungsprozesses in allen Einzelheiten zu verfolgen.

[1] A. Bajer, Acta Soc. Bot. Poloniae *23*, 383 (1954).

[1] A. Bajer, Acta Soc. Bot. Poloniae *22*, 475 (1953).

Chromosome Structure and Meiosis in a Pentatomid Bug

Considerable attention has of late been paid to studies on the chromosomes of heteroptera (MAKINO[1], WHITE[2]). In India, MANNA[3] has recently published quite an exhaustive account of chromosomes of Indian heteroptera and has reviewed the problem of chromosome number in as many as six sub-families, comprising a total of eleven tribes and has also discussed the problem of supergeneric classification in this group. The object of the present paper is to present a brief account of the structure of mitotic chromosomes and their meiotic behaviour in a species of Indian Pentatomid, *Bagrada picta* (F), belonging to the sub-family Pentatominae and tribe Pentatomini. The materials were collected at Delhi and their testes fixed in Sanfelice's fixative. Sections were cut at 12 μ in thickness and stained in Iodine crystal violet. Diagrams have been reproduced at a uniform magnification of 3670.

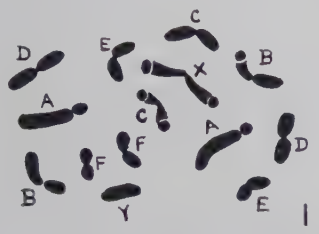


Fig. 1.–Spermatogonial prophase showing the morphology of chromosomes.

An inspection of the spermatogonial prophase (Fig. 1) or of metaphase plates (Fig. 2) reveals the chromosome number to be $2n = 14$ in the male. The chromosomes are typically heteropteran in form at the spermatogonial metaphase. It has been found after critical examination of a few spermatogonial prophase that the chromosomes are monocentric. The various chromosomes on the basis of their structure are as follows:

(1) X-chromosome—Longest in the complement and having a median primary constriction (*X*).

(2) A pair of long chromosomes with a subterminal primary constriction (*AA*).

(3) A pair of long chromosomes with a median primary constriction (*BB*).

(4) Two pairs of medium sized chromosomes with a median primary constriction (*CC*, *DD*).

(5) Y-chromosome—A medium sized chromosome without any constriction, apparently a rod-shaped one (*Y*).

(6) Two pairs of short chromosomes with a median primary constriction (*EE*, *FF*).

At the growth phase of meiosis, the sex chromosomes remain fused and, therefore, appear as a single heteropycnotic body lying close to the nuclear membrane, while other chromosomes are seen very faintly. There is always a single spherical nucleolus which is seen as a brownish body under the phase contrast microscope where the sex chromosome mass appears as a dark green structure and other chromosomes as filaments. This stage, therefore, corresponds to the earlier stage of meiosis. The single nucleolus is rarely found associated with the heteropycnotic sex chromosome mass (*R.M.*). At diplotene, there is usually a single chiasma per bivalent while occasionally two are seen in the longest bivalent. The two sex chromosomes remain as separate univalent structures. At metaphase I (Fig. 3), all the six autosomal bivalents, each containing a single terminalized chiasma, are found arranged regularly on the equatorial plate

Fig. 2.–Spermatogonial metaphase.

with the central region of the ring-like arrangement being always occupied by one or the other chromosomes (Fig. 4), the X-chromosome always remaining on the periphery. The first division anaphase is equational for

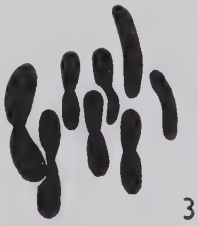


Fig. 3.–Metaphase I, side view.

the sex chromosomes (Fig. 5). At this stage separation is not found to be parallel since the chromosomes show a bent. The second division metaphase plates show only seven chromosomes (Fig. 6) with the sex chromosomes

Fig. 4.–Metaphase I, polar view.

forming a pseudobivalent. Anaphase *II* is reductional for the sex chromosomes and consequently one of the daughter nuclei contain the *X* while the other the *Y* chromosome (Fig. 7).

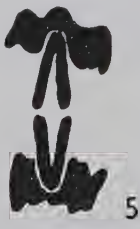


Fig. 5.–Anaphase I, showing equatorial division of the *x*-chromosome.

The existence of a localised centromere in the heteropterans has been doubted by SCHRADER[1], HUGHES-SCHRADER[2] and HUGHES-SCHRADER and RIS[3], who have mostly studied coccids belonging to homoptera. The

[1] S. MAKINO, *An atlas of the chromosome numbers in animals* (Iowa, 1951).

[2] M. J. D. WHITE, *Animal Cytology and Evolution* 2nd Ed. (Cambridge University Press, 1954).

[3] G. K. MANNA, Proc. zool. Soc. Bengal. *4*, 1 (1951).

[1] F. SCHRADER, Cytologia *6*, 422 (1935).

[2] S. HUGHES-SCHRADER, Z. Zellforsch. *13*, 742 (1931); Biol. Bull. Woods Hole *78*, 312 (1940); J. Morph. *70*, 261 (1942); Advances in Genetics. *2*, (1948).

[3] S. HUGHES-SCHRADER and H. RIS, J. exp. Zool. *87*, 429 (1941).

chromosomes of coccids obey quite a different law particularly in respect to orientation and anaphase disjunction, which is parallel. It is, therefore, not unlikely that these chromosomes have a "diffuse" centromere

Fig. 6.–Metaphase II, polar view.

similar to that of Lepidoptera (Fedeley[1], Suomalainen[2]) and Luzula (Castro, Camara and Malheiros[3]). Mendes[4] has for the first time reported to have seen the position of primary constriction as a non-staining gap in an heteropteran species, *Dysdercus*, belonging to the

Fig. 7.–Anaphase II.

family Pyrrhocoridae. It is, therefore, not quite improbable to expect a similar centromeric constriction in the chromosomes of other heteropterans as well. An experimental verification similar to that of LaCour[5] in Luzula and Hughes-Schrader and Ris[6] in *Steatococcus* is indeed desirable to support this statement.

I am greatly indebted to Dr. M. L. Bhatia, Head of the Department of Zoology, University of Delhi, for constant encouragement and to Dr. R. I. Sailer, Section of Insect detection and Identification, U. S. Department of Agriculture, Washington, 25, for kindly determining the specimen.

M. K. Dutt

Department of Zoology, University of Delhi, 8, India, December 21, 1954.

Résumé

Bagrada picta F. mâle possède 14 chromosomes dont une paire X–Y. Tous les chromosomes sont monocentriques à l'exception de l'Y chez lequel il est impossible de trouver un centromère localisé. Les autres éléments peuvent être, selon leurs dimensions et la position du centromère, rattachés à six types différents.

[1] H. Federley, Soc. sci. Fenn. *13*, 1 (1945).
[2] E. Suomalainen, Hereditas. *39*, 88 (1953).
[3] D. Castro, A. Camara and N. Malheiros, Proc. 8th Int. Congr. Genet. Stockholm *548*.
[4] L. O. T. Mendes, Bragantia. *9*, 53 (1949).
[5] L. F. LaCour, Heredity, Suppl. *6*, 77 (1952).
[6] S. Hughes-Schrader and H. Ris, J. exp. Zool. *87*, 429 (1941).

Notes on the Cytological Feature of Male Sterility in the Mule[1]

The mule and hinny are noted for their strength and endurance; they are good workers, being active and resistant to sickness. In general, mules and hinnies are sterile in both sexes, but female hybrids are said to come on heat and very rarely produce foals to the stallion or the jack-ass. There are no records of fertile male mules or hinnies.

Fig. 1.–Spermatogonial chromosomes of the horse.

The cytological study of the mule has remained incomplete. The chromosomes of the mule have been studied by Wodsedalek[1] and Leon[2] who report 51 and 38 chromosomes, respectively. In the light of the results of the chromosome investigations on the horse and ass by Makino[3], the reinvestigation of the mule chromosomes is desirable, because the work of both Wodsedalek and Leon is unsatisfactory by present-day standards. The present study became possible through the courtesy of Dr. Y. Nishikawa who placed the testicular material of a mule at the author's disposal. The specimen which furnished the material for this study was a male mule, three years of age, produced by crossing of a jack-ass with a mare.

Fig. 2.–Spermatogonial chromosomes of the ass.

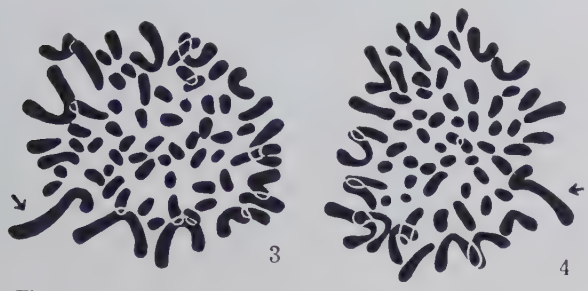
Before dealing with the account of the mule, it seems necessary to present some descriptions on the cytological features of the horse and ass, based on the results of the present author's former studies. The number of chromosomes of the horse was reported to be 66 in diploid (Makino[4]). The diploid complement shows at least 12 V-shaped chromosomes, each being characterized by submedian centromeres with dissimilar arms (Fig. 1). They are very prominent in appearance in contrast to the others with terminal centromeres.

The author's observations (Makino[5]) revealed that in general morphology the chromosomes of the ass were very similar to those of the horse though not entirely identical. The diploid complement of the ass consists of 66 chromosomes which reduce in meiosis into 33 bivalents. There are, as in the horse, at least 12 elements

[1] Contribution No. 326 from the Zoological Institute, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan. With a financial aid from the Scientific Research Fund of the Ministry of Education.

[1] J. E. Wodsedalek, Biol. Bull. *30*, 1–56 (1916).
[2] M. Van Leon, Ann. Gembloux *1938*, 44.
[3] S. Makino, Cytologia *13*, 26–38 (1943); Zool. Mag. (Tokyo) *56*, 8–15 (1944); Cytologia *16*, 288 (1952).
[4] S. Makino, Cytologia *13*, 26 (1943); Zool. Mag. (Tokyo) *56*, 8 (1944).
[5] S. Makino, Zool. Mag. (Tokyo) *56*, 8 (1944); Cytologia *16*, 288 (1952).

characterized by submedian centromeres in the complex (Fig. 2). But closer comparison reveals the constant occurrence of a pair of considerably large-sized J-shaped chromosomes with subterminal centromeres in the ass (indicated by arrows in Fig. 2). Since such a pair does not exist in the complex of the horse, it readily serves to differentiate cytologically the ass from the horse.



Figs. 3–4.–Spermatogonial chromosomes of the mule. × 4000.

The chromosomes of the mule were studied in the spermatogonial division, since the sections of the mule testis showed no cells in process of meiotic division. The number of chromosomes was found to be the same in the mule and its parent animals, horse and ass, namely 66 in diploid (Figs. 3 and 4). In general morphology, the chromosomes of the mule, horse and ass were found also to be very similar but not entirely identical. The diploid set of the mule contains also at least 12 chromosomes which are remarkable for having submedian centromeres. The most noticeable feature of the mule chromosomes, however, is the occurrence of a J-shaped element of considerably large-size, single in number (indicated by an arrow in Figs. 3–4). It is evident that this J-shaped element originated from the ass. From the cytological point of view, therefore, this J-shaped chromosome serves as a striking criterion for distinguishing the chromosome pattern of the mule from that of the parent species.

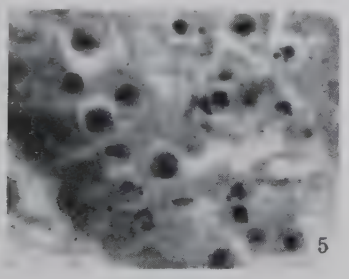


Fig. 5.–Showing pycnotic degeneration of spermatogonial cells in the mule testis. × 500.

So far as the testicular material here under study is concerned, the spermatogonial division proceeds regularly in the mule testes, but the spermatogenesis does not proceed beyond an early meiotic prophase. The germ-cells degenerate without forming the metaphase spindle of the first meiotic division. It seems probable that there are also many which undergo degeneration in the spermatogonial stage without going through meiosis (Fig. 5). Thus the meiotic division is entirely absent in the mule testes and no spermatozoa are formed. The seminiferous tubules of the testes show a remarkable decrease in diameter and contain a very small number of germ-cells (Fig. 6). In the majority of tubules, only one or two layers of such cells line their inner wall, and most of the cells found there are spermatogonia. The tubular lumina are empty, or sometimes contain a mass of degenerating cell debris. In striking contrast to the shrinkage of the seminiferous tubules, the interstitial tissue shows a remarkable development between the widely separated tubules. The structural difference of the testicular tissue is very striking between the mule and a horse of similar age (three years old), as seen in Figures 6 and 7.

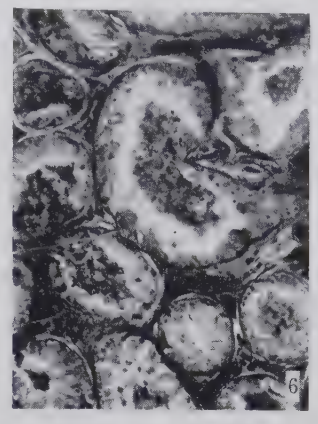


Fig. 6.–Sterile seminiferous tubules of the mule testis. × 80.

It was thus shown that the degeneration of male germ-cells of the mule which directly leads to sterility took place during an early stage of the meiotic prophase and no spermatozoa were produced. The mule from which the present material was derived, showed normal sex drive and mated with mares, but was completely sterile.

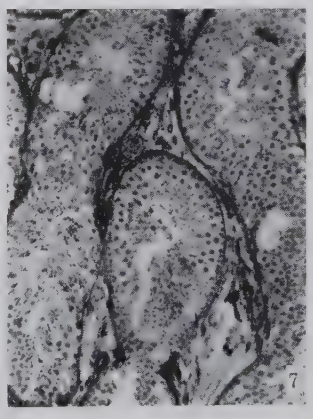


Fig. 7.–Seminiferous tubules of the horse testis. × 80.

The cytological phenomena of sterility here observed in the male mule show general similarity to those of hybrid sterility in the cross between *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. These two species possess metaphase chromosomes which appear quite identical each other, whereas the hybrids between them are completely sterile. Neither spermatogenesis nor oogenesis advance beyond spermatogonia and oogonia in the hybrid gonads (KERKIS[1]). Sturtevant[2] showed that the arrangement of genes was different between these two species of *Drosophila*. It was assumed that structural

[1] J. KERKIS, J. Exp. Zool. *66*, 477 (1933); Amer. Nat. *70*, 81 (1936).

[2] A. H. STURTEVANT, Genetics *5*, 488 (1920); *6*, 179 (1921); Carnegie Inst. Publ. *399*, 1 (1929).

differences in gene sequence between the parental chromosomes may be the cause of failure of pairing at meiosis in hybrids. But it is known that in *Drosophila*, failure of pairing is not due to mere mechanical impediments. Probably, failure of synapsis in hybrids must be due to a combination of mechanical and physiological impediments. It should be considered, as pointed out by White[1], that each of the parental species probably contains within its chromosomes a large number of genes which control many physiological processes essential to fertile reproduction. The fertile offspring may be produced when all these genes are sufficiently identical in the two parents.

S. Makino

Zoological Institute, Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan, February 18, 1955.

Zusammenfassung

Untersuchungen der Spermatogenese beim Pferd und Esel haben die diploide Chromosomenzahl 66 und die haploide Zahl 33 eindeutig ergeben. Die gleiche Zahl 66 kann beim Maulesel festgesetzt werden. Der Hoden des Maulesels enthält keine Spermatozytenteilung, trotzdem Spermatogonienteilung vorhanden ist. Unfruchtbarkeit beim Maulesel wegen Mangels beider Reifeteilungen hat sich mit Sicherheit feststellen lassen.

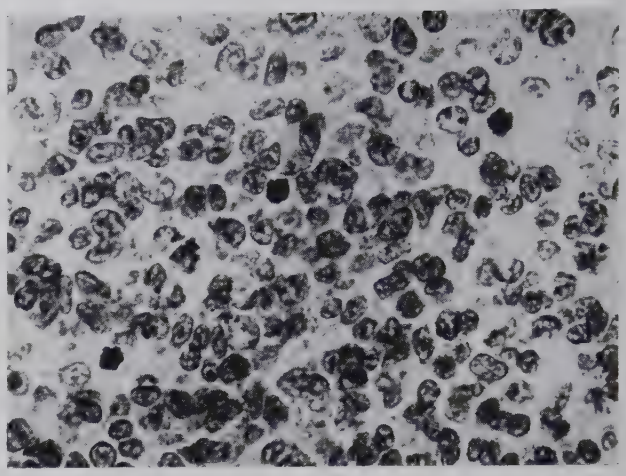
[1] M. J. D. White, *Animal Cytology and Evolution*, 2nd ed. (Cambridge Univ. Press, 1954).

De l'existence d'une multiplication de noyaux dans le cerveau du rat après la naissance

Au cours de recherches antérieures[1], il a été démontré que l'acide désoxypentosenucléique (A.D.N.) du cerveau continue à s'accroître après la naissance chez certaines espèces animales telles que le rat, le chien, le chat, le lapin ainsi que chez l'homme. Etant donné que la quantité moyenne d'A.D.N. des noyaux ne subit pas dans ces conditions de variations sensibles, il convenait de déduire de l'accroissement de l'A.D.N. une augmentation du nombre des noyaux, voire des cellules. Cette notion est évidemment en contradiction avec les données classiques selon lesquelles la multiplication cellulaire se termine à la naissance. Il nous a donc paru intéressant de chercher dans une étude histologique la confirmation de la multiplication nucléaire post-natale, au niveau du cerveau. Par la même occasion, il était intéressant de définir la nature des cellules qui continuent à se multiplier. Compte tenu de l'accroissement de l'A.D.N. qui est, chez le rat, de l'ordre de 11,4% par jour jusqu'au 15e jour, on pouvait prévoir que le taux des cellules en mitoses doit être très faible, surtout si ces mitoses ne sont pas de longue durée. Aussi n'avons-nous pas été étonnés de l'impossibilité de mettre en évidence directement des mitoses au niveau du cerveau de rat dans les premiers 15 jours après la naissance. Nous avons, de ce fait, procédé à l'injection de colchicine avant le prélèvement et l'examen des coupes de cerveau.

Nos essais ont porté sur 8 rats dont l'âge variait de 4 à 8 jours, qui ont reçu 0,1 mg de colchicine pour 100 g de poids frais en injection sous-cutanée, puis 0,2 mg

[1] P. Mandel et R. Bieth, C. r. Acad. Sci. *235*, 485 (1952).



Microphotographie à l'immersion d'une zône profonde de l'hémisphère. On remarque facilement l'existence de 4 mitoses typiques (sur une diagonale allant du coin inférieur gauche au coin supérieur droit) d'éléments de nature gliale. (Rats âgés de 8 jours.) (Hématoxyline au fer seule; grossissement × 650.)

après un intervalle de 3 h. Les animaux ont été sacrifiés 2 h après la 2e injection. Les cerveaux prélevés ont été fixés au liquide de Bouin et inclus à la paraffine. Les coupes ont été colorées aux techniques usuelles: hémalun-éosine; hématoxyline au fer seule; trichrome de Masson; hématoxyline phospho-tungstique de Mallory et examinées à l'immersion. Les résultats de nos essais ont été parfaitement concluants. Nous avons pu mettre en évidence des mitoses au niveau de la névroglie comme en témoigne la microphotographie ci-contre.

Nous pensons avec Herlant[1] qu'il n'est pas possible de déterminer exactement un taux de mitoses après injection de colchicine, mais cela n'a pas été notre but, le problème quantitatif étant résolu par les dosages d'A.D.N.

Il nous paraît également utile d'insister sur l'intérêt des études quantitatives de l'acide désoxyribonucléique au cours de la croissance, études qui permettent de mettre en évidence la présence d'une multiplication de noyaux et d'en évaluer l'intensité, là où l'histologie classique peut être défaillante.

P. Mandel, L. Fruhling et J. D. Weill

Institut de Chimie biologique et Institut d'Anatomie pathologique, Faculté de Médecine, Université de Strasbourg, le 2 avril 1955.

Summary

The increase of the central nervous system desoxyribonucleic acid of the rat after birth has led to the recognition of a multiplication of the brain cells nuclei during the period after birth[2]. Histological studies confirm the conclusions of the biochemical investigations and allow localization of nuclear multiplications in the neuroglia.

[1] M. Herlant, Ann. Endoc. *10*, 313 (1949).

[2] P. Mandel et R. Bieth, C. r. Acad. Sci. *235*, 485 (1952).

Heterologe Transplantation von Tumoren bei Vorbehandlung der Empfängertiere mit Gewebe der Spendertiere während der Embryonalzeit[1]

Die Überlebenszeit von homologen und heterologen Transplantaten ist sehr begrenzt. Nach den klassischen Arbeiten von MEDAWAR liegen der Zerstörung von homologen Transplantaten immunologische Mechanismen zugrunde (zusammenfassende Darstellung siehe MEDAWAR[2]). BILLINGHAM, BRENT und MEDAWAR[3] gelang es mit einer neuen Methode, ein unbegrenztes Überleben homologer Hauttransplantate zu ermöglichen. Sie besteht darin, dem Empfängertier eines Stammes *A* während des embryonalen Lebens Gewebe eines Tieres des Spenderstammes *B* zu überimpfen. Sie erreichten damit eine aktiv erworbene Toleranz gegenüber homologem Gewebe. Wir haben versucht, dieses Prinzip auch bei der heterologen Transplantation von Tumorgewebe anzuwenden. Als Transplantationssystem diente uns die Übertragung des Mäuse-Crockersarkoms S 180 auf Ratten.

Methodik

A. *Vorbehandlung der Rattenembryonen mit Mäusezellsuspensionen.* 150–250 g schwere schwangere Albinoratten wurden 1–7 Tage vor dem Geburtstermin operiert. In Avertinnarkose wurde die Bauchhöhle eröffnet und der Uterus vorgelagert. Die Embryonen waren durch die durchsichtige Uteruswand gut erkennbar. Die Injektionen von Mäusegewebe erfolgten mittels einer feinen Nadel durch die Uteruswand in den Rumpf der Embryonen. Die Rattenembryonen erhielten eine Mischung von Leber- und Milzgewebe erwachsener Albinomäuse. Die Zellsuspensionen stellten wir folgendermassen her: Leber und Milz wurden steril entnommen, fein zerkleinert und in physiologischer Kochsalzlösung im Potter-Apparat homogenisiert. Diese Mäusezellsuspensionen wurden den Rattenembryonen je nach Grösse in einer Menge von 0,025 bis 0,05 cm^3 eingespritzt. Nachher erfolgte sorgfältige Naht von Peritoneum, Bauchdecken und Haut. Ein Teil der vorbehandelten Embryonen wurde jeweils tot geboren. Der andere Teil entwickelte sich normal.

B. *Transplantation von Mäuse-Crockersarkom S 180.* Sobald die jungen Ratten ein Gewicht von 50 g erreichten, wurde ihnen das Mäuse-Crockersarkom S 180 subkutan implantiert. Die transplantierten Tumorstückchen hatten eine Grösse von 1 bis 2 mm^3 und wurden weissen Mäusen von etwa 12 g entnommen. Als Kontrollen verwendeten wir Albinoratten von 50 g, denen jeweils Stückchen des gleichen Tumors implantiert wurden. Als Mass der Tumorgrösse diente uns das Produkt aus den beiden grössten Durchmessern des Tumors.

Resultate

Bei den Kontrollratten wuchs der Mäusetumor nur während einiger Tage und in ganz geringem Ausmass weiter. Bei den vorbehandelten Ratten entwickelte er sich jedoch sehr rasch zu beträchtlicher Grösse. Aus der Tabelle ist der Unterschied in der durchschnittlichen Tumorgrösse zwischen vorbehandelten und Kontrollratten ersichtlich. Nach 10–15 Tagen bildeten sich jedoch die Tumoren langsam zurück und wurden nekrotisch.

Durchschnittliche Tumorgrösse bei vorbehandelten und Kontrollratten, 10 Tage nach der heterologen Transplantation mit Mäuse-Crockersarkom S 180.

Ratten 50 g Gewicht	Anzahl der Tiere	Tumorgrösse in mm^2 Länge × Breite
Kontrolltiere	12	6
Mit Mausgewebe in der Embryonalzeit vorbehandelte Tiere	22	350

Durch Vorbehandlung von Rattenembryonen mit Mäusezellsuspensionen gelingt es, die Abwehr dieser Ratten gegen später implantiertes Mäusetumorgewebe zu modifizieren. Wir erreichten nur eine partielle Toleranz gegenüber heterologem Tumorgewebe, während BILLINGHAM, BRENT und MEDAWAR[1] gegenüber homologem Hautgewebe eine totale Toleranz beobachteten. Möglicherweise beruht dies darauf, dass die immunologischen Reaktionen gegenüber heterologem Gewebe nur abgeschwächt werden, während sie gegenüber homologem Gewebe völlig ausgeschaltet werden.

W. BOLLAG

Medizinische Universitätsklinik, Kantonsspital Zürich, den 30. November 1954.

Summary

Rats were treated during embryonic life with mouse tissue. When these rats had reached a weight of 50 g they were implanted with the Crocker sarcoma S 180 of the mouse. These heterologous tumors grew to a large size but not indefinitely.

[1] R. E. BILLINGHAM, L. BRENT und P. B. MEDAWAR, Nature *172*, 603 (1953).

Die Eisenaufnahme der Normoblasten in bezug auf ihre Reifungsaktivität

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns zur Aufgabe gesetzt, zu untersuchen, wie das erythropoetische Gewebe das Eisen verwertet.

Der Versuch wurde an 4 Hunden ausgeführt. Jedem wurde nüchtern durch Magensonde 5 mg $^{55}FeCl_2$, äquivalent etwa $2 \cdot 10^6$ Impulsen, je Minute verabreicht. Die regelmässig in Intervallen von 24 h entnommenen Blutproben wurden auf ihre Radioaktivität je Volumeinheit der zentrifugierten Erythrozytenmenge geprüft. Die totale Radioaktivität, die von 24 zu 24 h im Gesamthämoglobingehalt vorhanden ist, wurde auf Grund der Erythrozytenmassenwerte berechnet.

Die grösste Konzentration des markierten Eisens wurde in den kreisenden Erythrozyten in der dritten Woche nach der Verabfolgung vorgefunden. Die täglich für jeden Hund bestimmten Anteile wurden als Prozente der entsprechenden verwerteten Maximalquoten angegeben. Aus den so erhaltenen Prozentzahlen wurden für jeden Tag Mittelwerte berechnet, wobei für den 18. Tag eine Verwertung von 100% anzunehmen ist (siehe Tabelle).

[1] Die Arbeit wurde mit Hilfe des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung durchgeführt.

[2] P. B. MEDAWAR, General problems of immunity in Preservation and Transplantation of normal tissues. J. + A. Churchill Ltd., London, 1954.

[3] R. E. BILLINGHAM, L. BRENT und P. B. MEDAWAR, Nature *172*, 603 (1953).

Zeit in Tagen	Mengen des ^{55}Fe in den kreisenden Erythrozyten in %					Durchschnittswerte der Mengen des ^{55}Fe in %					
	Hunde				Durchschnittswerte	täglich ausgeschwemmt		vom erythropoetischen Gewebe täglich aufgenommen	von den Zellelementen des erythropoetischen Gewebes täglich in jedem der drei angenommenen Reifegrade aufgenommen		
	1.	2.	3.	4.		experimentell	berechnet		3.	2.	1.
1	4,61	6,40	4,52	2,75	4,57	4,57	(4,57)	38,08	4,57	7,95	25,56
2	15,66	20,62	14,93	10,15	15,34	10,77	(10,77)	23,57	2,82	4,92	15,82
3	50,81	56,68	44,13	38,70	47,58	32,24	(32,24)	14,60	1,75	3,04	9,80
4	69,71	74,94	62,41	54,90	65,49	17,91	19,96	9,04	1,08	1,88	6,07
5	83,79	89,18	77,91	64,62	78,85	13,36	12,36	5,60	0,67	1,16	3,75
6	88	97,52	85,26	77,06	86,96	8,11	7,65	3,46	0,41	0,72	2,32
7	90,55	98,73	93,18	85,38	91,96	5	4,74	2,12	0,25	0,44	1,44
8	93,01	99,33	96,22	90,56	94,78	2,82	2,93	1,33	0,16	0,27	0,89
9	94,44	99,67	97,73	93,08	96,23	1,45	1,82	0,82	0,09	0,17	0,55
10	95,95	99,83	99,34	94,60	97,43	1,20	1,13	0,51	0,06	0,10	
12	97,38	100	99,76	96,45							
15	98,96		100	98,22							
18	99,68			99,16	100				12,01	20,87	67,12
21	100			99,75							
24				100							

Die Differenz der Konzentration im kreisenden Hämoglobin an zwei aufeinanderfolgenden Tagen ist gleich der Menge des radioaktiven Hämoglobineisens, das pro Tag ausgeschwemmt wird. In der Tabelle sind die Prozente der total verwerteten Menge angegeben. Man kann beobachten, dass die tägliche Ausschwemmung in den ersten 3 Tagen progressiv ansteigt, um dann vom 4. Tage an wieder abzunehmen.

Aus den Daten, die wir über die mittlere Reifungsdauer des Normoblasten[1] und des Retikulozyten[2] besitzen, lässt sich berechnen, dass die Zeit zwischen dem Augenblick, in dem die Zelle anfängt, Eisen aufzunehmen (Beginn der Polychromatophilie), und dem Augenblick, in dem sie in den Kreislauf ausgeschwemmt wird (2. retikuläre Reifungsphase Heilmeyers[3]), im Durchschnitt 3 Tage beträgt.

Wir teilen nun diese Reifungsperiode in 3 gleiche, aufeinanderfolgende Phasen zu je 24 h ein und bezeichnen diese als ersten, zweiten und dritten Reifegrad. Das vom erythropoetischen Gewebe in jedem Zeitpunkt aufgenommene Eisen verteilt sich auf alle im Augenblick anwesenden Elemente, die sich im 1., 2. oder 3. Reifegrad befinden.

Die im kreisenden Hämoglobin am Ende des ersten Tages anwesende Menge Radioeisens (= 4,57%) entspricht der Menge, die am selben Tage von den im 3. Reifegrad befindlichen Zellelementen aufgenommen wurde. Die Menge, die am 2. Tage im kreisenden Hämoglobin erscheint (= 10,77%) ist gleich der von den Elementen im 2. und 3. Reifegrad am ersten und zweiten Tage aufgenommenen. Die am dritten Tage ausgeschwemmte Menge (= 32,24%) ist gleich der Summe der von den Elementen im 1., 2. und 3. Reifegrad am ersten, zweiten oder dritten Tage aufgenommenen Mengen.

Wenn sich nun die vom erythropoetischen Gewebe aufgenommene Radioeisenmenge Tag für Tag konstant hielte, so könnte man annehmen, dass von der in den Kreislauf am zweiten Tage ausgeschwemmten Menge (= 10,77%) der von den Elementen im 3. Reifegrad verwertete Anteil demjenigen im gleichen Stadium am ersten Tage aufgenommenen und ausgeschwemmten gleich sei (= 4,57%). Der übrigbleibende wäre dann also der Anteil (10,77%–4,57% = 6,20%), der von den am ersten Tage im 2. Reifegrad befindlichen Zellelementen aufgenommen worden ist. Wenn wir dieser Annahme weiter für die am dritten Tage in Umlauf gesetzte Menge (32,24%) folgen, so könnte man behaupten, dass davon 4,57% von Zellelementen des 3. Reifegrades verwertet werden, während 6,20% auf die Zellelemente im 2. Reifegrad entfallen. Der verbleibende Teil (32,24% – [4,57% + 6,20%] = 21,44%) ist in den Zellelementen des 1. Reifegrades enthalten. Die am ersten Tage vom erythropoetischen Gewebe aufgenommene Menge wäre dann der am dritten Tage ausgeschwemmten gleich.

Dagegen ist es ohne weiteres klar, dass die vom erythropoetischen Keimgewebe verbrauchte Menge am zweiten Tag prozentual *kleiner* ist als am ersten Tag und auch an den folgenden Tagen laufend abnimmt. Daraus folgt, dass von dem am zweiten Tage ausgeschwemmten Anteil (10,77%) nicht 4,57%, sondern *weniger* von den Zellelementen im 3. Reifegrad aufgenommen worden ist und daher nicht 6,20% sondern eine etwas *grössere* Menge von den Elementen im 2. Reifegrad verwertet wurde. Wenn wir jetzt die gleiche Überlegung auch auf den dritten Tag anwenden, so kommen wir zum Schluss, dass nicht nur 21,44% am ersten Tage von den Erythroblasten im 1. Reifegrad ausgenützt worden sind, sondern ein *höherer* Prozentsatz.

Die am ersten Tage vom erythropoetischen Gewebe aufgenommene Gesamtmenge entspricht also der Summe: 4,57 + (> 6,20%) + (> 21,44%), und diese Summe ist natürlich *grösser* als (4,57% + 6,20% + 21,44%) = 32,24%, das heisst *grösser* als die Menge, welche am dritten Tage ausgeschwemmt wird.

Diese Menge haben wir nun mit Hilfe der fortgesetzten Approximationsrechnung berechnet, unter der Voraussetzung, dass

1. der vom erythropoetischen Gewebe am ersten Tage aufgenommene Prozentsatz zumindest der am dritten Tage im Kreislauf auftretenden Menge gleich ist und dass

2. der am Ende des ersten Tages in Umlauf befindliche Prozentsatz die von den Zellelementen aufge-

[1] F. Koller, Dtsch. Arch. Klin. Med. *184*, 568 (1939). – A. Baserga, Progr. Med. *2*, 394 (1946). – G. Astaldi und P. Tolentino, J. Clin. Path. *2*, 217 (1949).

[2] A. Nizet, Acta Biol. Belg. *2*, 170 (1942). – C. M. Plum, Acta Haematol. *2*, 317 (1949).

[3] K. Rohr, *Das menschliche Knochenmark* (Verlag Thieme, Stuttgart 1949).

nommene Menge ist, die ihre Reife innerhalb 24 h beendet haben (Elemente im 3. Reifegrad).

Es wurden dann proportional die Prozentsätze des Eisens berechnet, das an den folgenden Tagen aufgenommen wird, sowie ihre Verteilung auf die drei von uns angenommenen Reifegrade. Die so berechneten Werte wurden in die Tabelle eingesetzt: In der Kolonne 4 befinden sich die Werte bezogen auf die täglich vom erythropoetischen Gewebe verwerteten Prozentsätze, und in der 5. Kolonne sind die von den Zellelementen im 1., 2. oder 3. Reifegrad täglich aufgenommenen Mengen eingetragen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen erlauben nun die Art und Weise zu definieren, in der das erythropoetische Gewebe eine bestimmte exogene Eisenmenge verwertet:

1. *Täglich vom erythropoetischen Gewebe verwertete Prozentsätze.* Die Hauptmenge des Eisens (38%) wird vom erythropoetischen Gewebe am ersten Tage aufgenommen. Im weiteren Verlauf sinken die aufgenommenen Eisenmengen ständig ab.

Ein Überschlag über die im Laufe der Zeit vom erythropoetischen Gewebe insgesamt aufgenommenen Eisenmengen ergibt, dass 50% der Gesamtmenge in etwa 1½ Tagen verwertet wird. Wir bezeichnen diesen Zeitabschnitt als die Halbperiode der Aufnahme. Die mittlere Verwendungszeit ist also 3 Tage.

2. *Prozentsätze der Mengen, die täglich von den erythropoetischen Zellelementen in den 3 angenommenen Reifegraden im Laufe von je 24 h aufgenommen werden.* Jede der täglich von dem erythropoetischen Gewebe aufgenommenen Mengen verteilt sich auf die 3 angenommenen Reifegrade so, dass die Zellen im 1. Reifegrad (Reifungsdauer = 48–72 h) 67,12% aufnehmen; jene des 2. Reifegrades (Reifungsdauer = 24–48 h) 20,87% und die des 3. Reifegrades (Reifungsdauer = 0–24 h) 12%. Es scheint klar, dass die von den Zellelementen verwertete Eisenmenge mit dem Fortschreiten der Reifung abnimmt. Und zwar werden von der von den Zellelementen aufgenommenen Eisenmenge 67,12% am ersten, 20,87% am zweiten und 12% am dritten Tage verwertet. Wenn wir nun diese Werte als Zeitfunktion in einem Diagramm darstellen, so geht daraus hervor, dass 50% des Eisens von den Normoblasten in etwa 15 h aufgenommen werden.

U. Salera, G. Tamburino und S. Finocchiaro

Medizinisch-pathologisches Institut der Universität Rom, den 15. Dezember 1954.

Riassunto

Gli autori studiano l'utilizzazione del ferro esogeno da parte del tessuto eritropoietico. In base ai dati relativi alla velocità di immissione in circolo dell'Hb marcata, dopo somministrazione enterale di ^{55}Fe, essi stabiliscono che: 1. la massima quota di ferro viene utilizzata dal tessuto eritropoietico il primo giorno; 2. il 50% della quantità totale destinata all'emoglobinogenesi viene utilizzata in 1,5 giorni (= semiperiodo di utilizzazione); 3. l'assunzione di ferro da parte dell'eritroblasto è un processo continuo, che una volta iniziato, si svolge durante tutto il rimanente periodo di maturazione (3 giorni); 4. la quantità di ferro utilizzata dall'elemento cellulare decresce con il progredire della maturazione: il 50% viene assunto in circa 15 ore.

Über Vorkommen von Kohlensäureanhydratase in der menschlichen Haut

Von Kurata[1] wurde erstmals eine Methode zur Darstellung der Kohlensäureanhydratase (KAH) angegeben. Das technische Vorgehen wurde zur Erreichung eines einwandfreien Fermentnachweises in histologischen Schnitten von uns modifiziert. Abbildung 1 zeigt Ablagerungen von schwarzem Kobaltsulfid als Zeichen starker Fermentaktivität in den Tubulus-Epithelien der Niere.

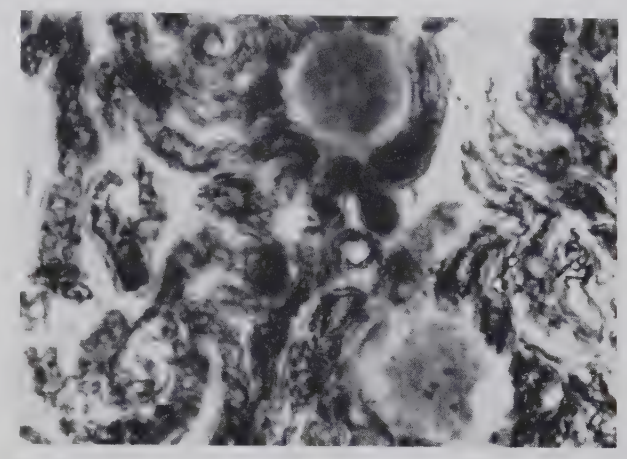


Abb. 1. Niere des Meerschweinchens. Intensive Kohlensäureanhydratase-Aktivität (Kobaltsulfid-Niederschläge) in den Tubulus-Epithelien.

Unter gleichem Vorgehen gelang es uns, auch in der menschlichen Haut KAH nachzuweisen. Bei relativ geringem Vorkommen von KAH in den basalen Zellagen der Epidermis überraschte die intensive Fermentaktivität in den sekretorischen Epithelien der ekkrinen Schweissdrüsen (Abb. 2). Wahrscheinlich ist diese hohe

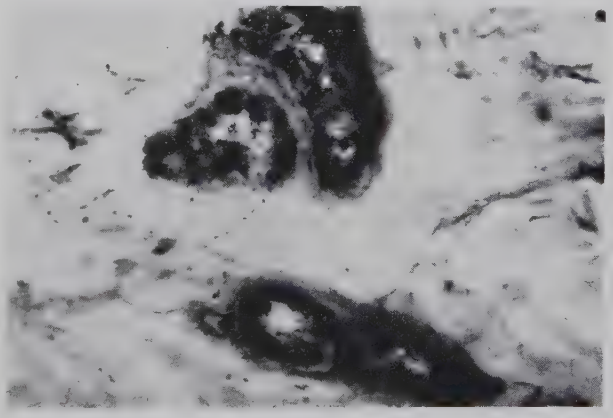


Abb. 2. Ekkrine Schweissdrüsen der menschlichen Haut. Intensive Kohlensäureanhydratase-Aktivität in den sekretorischen Epithelien.

Fermentaktivität mit der sauren Reaktion des Schweisses in Verbindung zu bringen. In diesem Sinne sprechen auch Versuche mit dem KAH-Inhibitor Diamax (Lederle). Eine ausführliche Veröffentlichung unserer histochemischen Methode, der Befunde sowie ihrer Deutung hinsichtlich des pH und der Ionenzusammensetzung im Schweiss ist im Archiv für Dermatologie und Syphilis vorgesehen.

O. Braun-Falco und B. Rathjens

Universitäts-Hautklinik Mainz, den 28. Januar 1955.

[1] K. Y. Kurata, Stain. Technol. *28*, 231 (1953).

Summary

Carbonic anhydrase activity, as demonstrated histochemically, is present in human skin. Especially high enzyme activity was found in eccrine sweat glands. Probably there are relations between acide nature of sweat and enzyme activity. Full-length report see in Arch. Dermat.

Veränderungen der thermoelastischen Eigenschaften von Sehnenfasern beim Altern

Bei Untersuchung der Frage, ob beim Altern charakteristische Veränderungen im elastischen Gewebe bzw. Collagen[1] vor sich gehen, wurden die thermoelastischen Eigenschaften an den Sehnen des Schwanzes von weissen Ratten verschiedenen Alters geprüft.

Die Tiere stammten aus der Inzucht unseres Institutes und waren 3–33½ Monate alt. Sie können vom 5. Monat an als erwachsen, vom 18. Monat an als alt bezeichnet werden. Sie erreichen nur in 50% ein Alter von 23½ Monaten.

Aus dem Schwanz der Ratte lassen sich die Sehnen als Bündel feiner Fasern in Längen von mehreren Zentimetern mit Leichtigkeit auspräparieren. Wir haben 50 mm lange Stücke lebensfrisch in einer feuchten Kammer gewogen und auf gleiches Gewicht (20–21 mg), durch Ablösen einzelner Fäden, gebracht. Die Sehnenfäden wurden dann so in einen Plexiglashalter eingespannt, dass 15 mm zur Dehnung frei blieben. Dieses Stück wurde an einem empfindlichen Hebel, der in einem Kugellager lag, befestigt. Er hatte geringes Übergewicht und vergrösserte 9,5fach. Das Gewebstück befand sich in Ringer-Tyrode-Lösung, die erwärmt und mit Luftdurchperlung gemischt war.

Bei Registrierung der Länge der Sehnen sieht man zwischen 38 und 60°C nichts. Bei 3 und 4 Monate alten Tieren treten selbst bis 66°C keine Veränderungen auf. Oberhalb dieser Temperatur reissen die Sehnen ohne vorangehende Verkürzung.

Vom 5. Monat an erscheint bei Erwärmung auf 64 bis 66°C plötzlich eine Verkürzung. Hält man die Temperatur nun konstant, so bleibt diese während einiger Minuten bestehen. Erwärmt man noch etwas mehr, so wird die Sehne «glasig» und reisst zwischen 66 und 70°C.

Mit zunehmendem Alter ändert sich makroskopisch gar nichts an diesen Sehnen, aber die thermische Kontraktion bei 64–66°C nimmt vom 5. Monat an, also bei geschlechtsreifen Tieren, stark zu. In den nächsten zehn Monaten bleibt sie ziemlich gleich und beträgt etwa 10%.

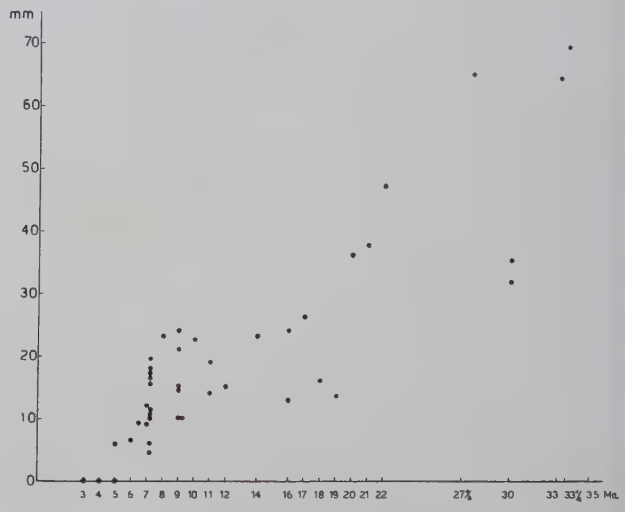
Nach dem 19. Monat und besonders bei 27–33 Monate alten Tieren tritt bei derselben Temperatur eine weit stärkere thermische Kontraktion ein. Sie kann bis 43% der ursprünglichen Länge betragen.

In Abbildung 1 ist die Verkürzung von Sehnen von 40 verschieden alten Tieren in mm des Hebelausschlages wiedergegeben. (Die tatsächliche Verkürzung ergibt sich durch Division mit der Hebelvergrösserung von 9,5.)

Wenn man bei Eintritt der Verkürzung sogleich wieder abkühlt, so ist die Kontraktion nur teilweise reversibel. Bei Wiedererwärmung verkürzt die Sehne sich nicht wieder und reisst schliesslich zwischen 66 und 76°C.

[1] D. A. Hall, R. Reed und R. E. Tunbridge, Nature *170*, 264 (1952).

Die thermoelastische Kontraktion von Sehnen ist seit Gotschlich[1] und Wöhlisch[2] bekannt. An den Sehnen des Rattenschwanzes sah sie Partridge[3]. Nach Banga[4] und Hall, Reed und Tunbridge[5] ist in der Sehne Elastin in einer amorphen Zementsubstanz eingebettet. Dieses Chondromukoid spielt bei der Wärmekontraktion keine Rolle. Dieselbe spielt sich am Elastin («F-Elastin»[4], «Proelastin»[5] bzw. am Collagen) ab.



Thermoelastische Kontraktionen von Sehnen aus dem Schwanz von Ratten bei 64–66°C. Ordinate: Hebelbewegung in mm. Vergrösserung 9,5fach. Länge der Sehne 15 mm. Abszisse: Alter der Tiere in Monaten.

Unser Befund weist darauf hin, dass sich am «Elastin» beim Altern charakteristische strukturelle Veränderungen entwickeln, deren weitere Untersuchung im Gange ist.

Die Versuche wurden von Frl. Elisabeth Heitz ausgeführt.

F. Verzár

Physiologisches Institut der Universität Basel, den 2. April 1955.

Summary

Tendons of the tail of white rats show a thermoelastic contraction after the fifth month of age which appears suddenly at 64–66°C. It is not seen in animals of 3–4 months old. After the nineteenth month, and especially in 27 to 33 month old rats, this contraction becomes much increased. It is supposed that this phenomenon expresses changes in the structure of "elastin" in ageing animals.

[1] E. Gotschlich, Pflügers Arch. *54*, 109 (1893).
[2] E. Wöhlisch, Z. Biol. *91*, 137 (1931) usw.
[3] S. M. Partridge, Biochem. J. *43*, 387 (1948).
[4] H. Banga, Nature *172*, 1098 (1953). – H. Banga, J. Baló und D. Szabó, Nature *174*, 788 (1954).
[5] D. A. Hall et al., loc. cit.

Veränderungen der thermoelastischen Kontraktion von Haut und Nerv bei alternden Tieren

Nachdem gezeigt wurde, dass Sehnen mit zunehmendem Alter ihre thermoelastischen Eigenschaften ändern[1], haben wir dasselbe auch bei zusammengesetzten Ge-

[1] F. Verzár und E. Heitz, Exper. *11*, 230 (1955).

weben, an der Haut und am Nerven geprüft. Benützt wurde derselbe Rattenstamm und dieselbe Methode wie früher.

Zur Untersuchung der *Haut* wird mit einem scharfen Hohlstempel von 25 × 5 mm ein Stück aus der Rükkenhaut ausgestanzt, zwischen Plexiglasklemmen an einem leichten Hebel befestigt, so dass ein 15 mm langes Stück frei wird. Es wird in mit Luft durchperlter Ringer-Tyrode-Lösung erwärmt.

In allen Altersklassen zwischen 3 und 33 Monaten tritt bei Erwärmung bis 60°C keine Verkürzung ein. Zwischen 64 und 66°C zeigen alle Hautstücke eine Kontraktion. Die Temperatur ist dieselbe wie bei den Sehnenfasern des Schwanzes[1], und man wird folgern müssen, dass es sich um eine Wirkung auf die elastischen Fasern der Haut handelt. Im Gegensatz zu den Schwanzsehnen zeigen bereits die 3–4 Monate alten Tiere die Verkürzung der Haut.

Abbildung 1 zeigt, dass diese bei 64–66°C entstehende Verkürzung mit zunehmendem Alter der Tiere grösser wird: von 5 mm Hebelausschlag im 3. Monat auf 28 mm im 22. Monat. Bei den zwei ältesten Tieren von 33 bis 33½ Monaten nahm sie wieder ab, vielleicht als Ausdruck einer Atrophie der Haut.

Gegenüber der thermischen Verkürzung der Sehne zeigt sich, dass die Verkürzung in mehreren Stufen erfolgt. Bei 67–70°C tritt eine zweite Verkürzung ein. In der Abbildung 1 entspricht das dem zweiten höheren Punkt.

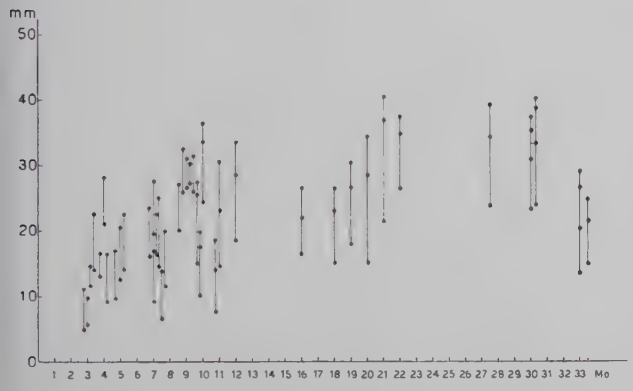


Abb. 1. Thermische Kontraktionen der Haut bei verschieden alten Tieren. Ordinate: Jede vertikale Linie entspricht einem Versuch. Der unterste Punkt ist die Verkürzung (Hebelausschlag in mm), welche bei der niedrigsten Temperatur entstand. Die darüberliegenden Punkte entsprechen den Verkürzungen, die bei den höheren Temperaturen stufenweise auftreten (siehe Text).

Abszisse: Alter der Tiere in Monaten.

Bis zum 9. Monat sahen wir nur diese zwei Stufen. Bei 10–27 Monate alten Tieren tritt noch eine dritte Verkürzung bei 74°C und bei 30–33 Monate alten Tieren noch eine vierte Stufe bei 81–82°C auf. Sie sind in Abbildung 1 ebenfalls übereinandergezeichnet. Die gesamte Verkürzung wird auf diese Weise von 12 mm im dritten Monat auf 41 mm im 21. Monat vergrössert. Dazwischen nehmen die Werte unregelmässig zu. Beim Altern treten also in der Haut neue Faktoren auf, welche eine thermoelastische Kontraktion ergeben. Allerdings sind die dabei auftretenden Verkürzungen bei Abkühlung nicht reversibel.

Auch der *Nerv* zeigt eine thermoelastische Kontraktion. Dabei spielt nicht die Bindegewebsscheide, sondern das eigentliche Nervengewebe eine Rolle, wie Dodt[2] gezeigt hat. Der Nervus ischiadicus von Ratten wurde ebenso wie früher die Sehnen[1] untersucht.

Bei Tieren im Alter von 3 und 4 Monaten verkürzt der Nerv bei Erwärmung bis 92°C sich mit unserer Methode fast nicht. Dann reisst er.

Vom 4. Monat an treten die thermoelastischen Kontraktionen auf, jedoch erst bei einer Temperatur von 76–80°C. Der Hebelausschlag beträgt 5–12,5 mm, etwa 10% der Länge. Mit zunehmendem Alter ändert sich vorerst nichts. Erst bei 27,5 bis 33,5 Monate alten Tieren wird die Verkürzung grösser, bis zu 22,5 mm (Abb. 2).

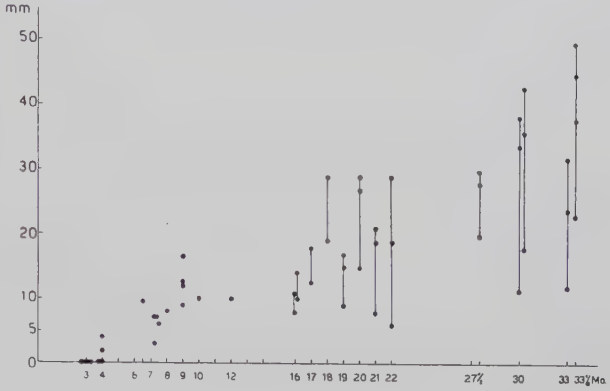


Abb. 2. Thermische Kontraktionen der Nerven bei verschieden alten Tieren. Abszisse und Ordinate wie in Abbildung 1.

Dagegen tritt ähnlich wie bei der Haut in zunehmendem Alter die Kontraktion in verschiedenen Stufen auf. Zwischen dem 16. und 33. Monat wird diese Erscheinung sehr auffallend, so dass die Gesamtverkürzung schliesslich 50 mm beträgt.

Im 16. Monat tritt die erste Verkürzung bei 76–80°C, die zweite bei 90–92°C auf. Bei 27 bis 33½ Monate alten Tieren trat die erste Kontraktion zwischen 70—76, die zweite bei 76–82 und die dritte bei 86–91°C auf. Gelegentlich erschien noch eine vierte bei 92°C. Auch die Reissfestigkeit erhöht sich. Oberhalb 16 Monaten reissen die Nerven bei dieser Methodik selbst bei 100°C nicht.

Nachdem die erste Verkürzung erst bei 76–80°C eintritt, kann es sich nicht um dieselbe Substanz handeln, wie in den Sehnen und der Haut. Das steht in Übereinstimmung mit dem Befund von Dodt[2].

Die mit dem Alter zunehmende Verkürzung bei noch höheren Temperaturen spricht dafür, dass auch im Nerven, ähnlich wie in der Haut, beim Altern qualitative Veränderungen entstehen. Sie spielen sich nicht am «Elastin» ab, sie schreiten jedoch in derselben Richtung wie in diesem und äussern sich in einer mit dem Alter zunehmenden thermischen Verkürzung.

Die Versuche wurden von Frl. Elisabeth Heitz ausgeführt.

F. Verzár

Physiologisches Institut der Universität Basel, den 12. April 1955.

Summary

The thermo-elastic contraction which has been found to increase with age in the tendons, has been studied in the skin. This shows a contraction between 64–66°C similar to that of tendon fibres. In 22 month old rats, it reaches 5–6 times greater values than in 3 month old

[1] F. Verzár und E. Heitz, Exper. *11*, 230 (1955.)
[2] E. Dodt, Exper. *11*, 65 (1955).

[1] F. Verzár und E. Heitz, Exper. *11*, 230 (1955).
[2] E. Dodt, loc. cit.

animals. The skin also shows a second contraction between 67 and 70° C. After the ninth month, in a continuously increasing degree, a third and fourth step of contraction appear at higher temperatures (up to 82° C).

The sciatic nerve also shows a thermo-elastic contraction after the fourth month at 76–80° C. This increases with age, and, as in the case with the skin, several more steps of contraction appear at higher temperatures, up to 92° C. It is improbable that these thermo-elastic contractions are related to «elastin». The changes with increasing age, however, show a similarity to the age changes of «elastin» in so far as the thermic contractility increases with age.

Vitamin Requirements of Decotylised Pea Seedlings Cultivated in the Dark

If the biosynthetic capacities of a decotylised pea seedling grown in darkness are compared with those of an excised pea root, certain differences can be observed. As has earlier been demonstrated[1], the seedlings, but not the excised roots, require arginine, glycine and adenine for optimum growth in an ordinary sucrose-mineral salt medium supplied with a mixture of water-soluble vitamins. Freshly excised roots on the other hand are quite unaffected by the three metabolites mentioned, and even in a vitamin-free medium they reach a length of at least 150 mm owing to the vitamin reserve present in the roots when excised. However, after one or two transfers of the root tips the growth comes to an end. Continued growth of the excised roots is made possible only by adding thiamin and niacin to the medium, in accordance with the observations of Addicott and Bonner[2].

If decotylised pea seedlings are cultivated in a vitamin-free medium identical with that used for excised roots but containing arginine, glycine and adenine, the growth very soon stops, as does that of the shoot later. The main root usually does not exceed a total length of 100 mm. A closer investigation demonstrated that in this case the vitamins thiamin and pyridoxin are required, while niacin possessed a very weak or no effect (see table).

The effect of thiamin (B_1), pyridoxin (B_6) and niacinamide (Nic), each 100 μg/l, on the growth of decotylised pea seedlings ("Torsdag III" variety) cultivated in darkness at + 25° C. Nutrient solution supplemented with arginine, glycine and adenine, each 0·3 mM, and solidified with 1·5% agar. Each culture tube contained 10 ml of nutrient medium. Incubation time 15 days. The original root length 31 mm. Ten plants, or roots, in each series. Further particulars of the cultivation technique published elsewhere[3].

Experimental material	Vitamins added	Length in mm		No. of laterals per root system
		Shoot	Main root	
Decotylised plants	No vitamins	111 ± 3	84·7 ± 4·2	7·1
	B_6 + Nic	114 ± 3	90·8 ± 3·6	8·6
	B_1 + Nic	116 ± 3	91·4 ± 6·9	6·9
	$B_1 + B_6$	116 ± 1	123·0 ± 2·6	10·6
	$B_1 + B_6$ + Nic	113 ± 2	136·5 ± 2·5	11·2
Excised roots	No vitamins	–	134·0 ± 3·9	17·6
	$B_1 + B_6$ + Nic	–	142·4 ± 1·0	17·1

[1] N. Fries, Physiologia Plantarum *6*, 292 (1953); Symbolae Botan. Upsal. XIII, *1*, 1 (1954).
[2] F. T. Addicott and J. Bonner, Science *88*, 577 (1938).
[3] N. Fries, Symbolae Botan. Upsal. XIII, *1*, 1 (1954).

This shows that in darkness the shoot is not only unable to produce these vitamins, but also utilizes most of the vitamin reserve of the hypocotyl and the young root. The pyridoxin requirement may indicate a complete inability or at least an insufficient ability to produce pyridoxin in the shoot. The pyridoxin synthesising power of the root is obviously sufficient for maintaining the growth of the root but not for the combined requirements of root and shoot.

These observations, together with others made earlier[1], show that even under completely heterotrophic conditions the morphogenesis of the pea plant is accompanied by a differentiation into parts differing from each other as regards the ability to synthesise essential metabolites.

The investigation was supported by a grant from Eli Lilly and Co., Indianapolis.

N. Fries

Institute of Physiological Botany, University of Uppsala, January 12, 1955.

Zusammenfassung

Abgeschnittene Erbsenwurzeln wachsen, wie schon frühere Untersuchungen gezeigt haben, unbegrenzt in einer Nährlösung mit Thiamin (Vitamin B_1) und Niacin als die einzigen zugesetzten Vitamine. Das konnte auch mit der in dieser Arbeit verwendeten Erbsenrasse bestätigt werden. Dekotylisierte Erbsenkeimlinge, die unter denselben Bedingungen in Dunkelheit kultiviert wurden, brauchten aber Thiamin und *Pyridoxin* (Vitamin B_6). Ein Bedürfnis von Niacin zeigte sich dagegen während der angewandten Versuchszeit bei diesen Keimlingen nicht.

[1] N. Fries, Physiologia Plantarum *6*, 292 (1953); Symbolae Botan. Upsal. XIII, *1*, 1 (1954). – S. Saubert-v. Hausen, Physiologia Plantarum *1*, 85 (1948).

Le potassium et le sodium de l'humeur aqueuse du lapin et leurs variations sous l'effet de l'acétazolamide (Diamox)

De récentes recherches ont démontré que la tension intra-oculaire s'abaisse, surtout en cas de glaucome, après l'administration d'acétazolamide (Diamox)[1]. Cependant, le mécanisme de cette action n'est pas élucidé. On sait que l'acétazolamide est un inhibiteur spécifique de la carboanhydrase, ferment qui catalyse l'hydratation du CO_2 et peut favoriser la formation des bicarbonates. Or, le corps ciliaire contient de la carboanhydrase[2]. De plus, l'humeur aqueuse présente un taux de bicarbonates assez important, supérieur à celui du sang[3]. Ainsi on peut se demander si l'abaissement de la tension intra-oculaire, sous l'effet du Diamox, n'est pas dû à une inhibition de la carboanhydrase du corps ciliaire, et si ce ferment n'influence pas la composition ionique et la pression osmotique de l'humeur aqueuse. Nous nous sommes donc proposé d'étudier l'action du Diamox sur certaines électrolytes de la chambre antérieure, notamment sur les taux du sodium et du potassium.

Matériel et méthodes. Nous avons utilisé 21 lapins de 2,5 à 3 kg, soumis à des conditions de vie identiques.

[1] B. Becker, Amer. J. Ophth. *37*, 13 (1954).
[2] P. H. Wistrand, Acta Physiol. Scand. *24*, 144 (1951).
[3] V. D. Kinsey, A.M.A. Arch. Ophth. *50*, 401 (1953).

Potassium et sodium de l'humeur aqueuse sous l'effet du Diamox (comparaison avec des expériences témoins).

Expériences témoins (Avant et après l'injection intraveineuse de 2 cm³ de sérum physiologique)							*Effets du Diamox* (Injection intraveineuse de 100 mg/kg dans 2 cm³ de sérum physiologique)						
Lapins	Na mEq/l			K mEq/l			Lapins	Na mEq/l			K mEq/l		
	avant	après	écart	avant	après	écart		avant	après	écart	avant	après	écart
1	147	147	0	5,60	5,50	−0,10	1	142	137	−5	5,08	4,55	−0,53
2	149	149	0	5,35	5,00	−0,35	2	146	142	−4	5,16	4,42	−0,74
3	152	152	0	5,95	5,52	−0,43	3	142	140	−2	5,21	4,40	−0,81
4	148	144	−4	6,25	5,73	−0,52	4	147	147	0	5,10	4,15	−0,95
5	144	138	−6	5,72	5,53	−0,19	5	149	149	0	5,35	4,35	−1,00
6	156	150	−6	5,45	5,45	0	6	149	149	0	5,50	5,10	−0,40
7	156	156	0	5,12	5,04	−0,08	7	149	149	0	5,50	4,35	−1,15
8	146	146	0	4,60	4,60	0	8	153	149	−4	5,35	4,25	−1,10
9	157	157	0	4,60	4,24	−0,36	9	154	154	0	5,53	4,50	−1,03
10	149	149	0	5,50	5,50	0	10	147	147	0	5,46	4,90	−0,56
							11	154	154	0	4,85	4,11	−0,74
Moyenne	150,4	148,8	−1,6	5,41	5,21	−0,20		148,4	147,0	−1,4	5,28	4,46	−0,82
Ecart-type s						±0,20							±0,25

Toutes les expériences furent effectuées à la même heure du jour, de la façon suivante: l'animal est fixé sur une table *ad hoc*, qui maintient la tête immobile. Après la pose d'écarteurs des paupières et sans emploi d'anesthésique, nous ponctionnons la chambre antérieure d'un œil. Nous prélevons environ 0,1 cm³, dans lequel sont dosés le sodium et le potassium au moyen du spectrophotomètre à flamme Beckman DU.

Immédiatement après cette ponction, une partie des animaux a reçu, dans la veine marginale de l'oreille, 100 mg/kg de Diamox (sel sodique) dilué dans 2 cm³ de sérum physiologique (11 cas). Chez les autres, nous n'avons injecté que les 2 cm³ de sérum physiologique (10 cas témoins). Trois heures après l'injection, nous avons prélevé l'humeur aqueuse de l'autre œil et effectué les dosages déjà décrits.

Résultats et discussion

L'ensemble de nos résultats figure au tableau. En considérant les valeurs enregistrées avant l'injection, dans toutes les expériences, nous obtenons les taux moyens suivants, portant sur 21 cas: 149 ± 4,3 mEq/l de sodium et 5,34 ± 0,39 mEq/l de potassium. Kinsey trouve une valeur moyenne, pour le sodium, de 146,5 mEq/l[3].

Trois heures après l'injection de Diamox, nous n'observons pas de modification significative du taux de *sodium*, comparativement aux valeurs témoins (tableau).

Par contre, le taux du *potassium* s'est abaissé dans tous les cas, de 0,82 mEq/l en moyenne (15,3% de la valeur moyenne de contrôle), l'écart-type étant de ± 0,25 mEq/l. Les écarts extrêmes sont de −1,15 et −0,40 mEq/l. S'il existe aussi une baisse moyenne du taux de potassium chez les animaux témoins, elle est nettement plus faible que la baisse enregistrée après l'injection de Diamox (0,20 mEq/l, ou 3,8% de la valeur moyenne de contrôle; écart-type ± 0,20 mEq/l). Relevons que les écarts-types du groupe traité au Diamox et du groupe témoin sont comparables; les zones qu'ils délimitent sont nettement distinctes. En outre, les valeurs extrêmes des deux groupes ne se recouvrent que faiblement. Ajoutons que nous avons soumis ces résultats à divers autres calculs statistiques, tenant compte notamment de l'écart entre les variances: il peuvent être considérés comme significatifs[1].

De cet effet du Diamox sur le potassium de l'humeur aqueuse, il faut rapprocher la chute de la tension oculaire, observée chez le lapin comme chez l'homme[2,3]. On peut se demander quelle influence exercent sur l'œil l'augmentation du flux urinaire et surtout l'acidose sanguine dues au Diamox. Dans des expériences préliminaires, on aurait observé que l'acétazolamide entraîne une chute de la tension oculaire, chez le lapin néphrectomisé comme chez l'animal normal[2]. Relevons aussi que, chez l'homme, l'acidose est rarement capable d'abaisser nettement la tension intra-oculaire. Il est plus probable que les effets oculaires du Diamox soient dus, en partie du moins, à l'inhibition de la carboanhydrase présente dans le corps ciliaire. Ainsi ce dernier ferment semble contrôler la sécrétion et la composition de l'humeur aqueuse. Sur la base de nos résultats, on peut admettre qu'il influence le taux du potassium, en rapport probablement avec la formation des bicarbonates. D'autres recherches sont en cours.

L'acétazolamide va probablement permettre de préciser davantage le mécanisme de la secrétion de l'humeur aqueuse. Outre son intérêt thérapeutique, son action ouvre d'intéressantes perspectives dans l'étude physiopathologique du glaucome.

Nous remercions vivement Mlle A.-M. Köstlin, ainsi que M. F. Girardet, pour leur précieuse collaboration.

A. Falbriard, R. Zender,
M. C. Sanz et A. Franceschetti

Clinique thérapeutique, Clinique ophtalmologique et Laboratoire central de l'Hôpital cantonal de Genève, le 19 février 1955.

[1] Nous remercions vivement M. A. Linder, Professeur de Statistique à l'Université de Genève, d'avoir bien voulu vérifier nos résultats du point de vue statistique.

[2] B. Becker, Amer. J. Ophth. *38*, 109 (1954).

[3] W. M. Grant et R. R. Trotter, A. M. A. Arch. Ophth. *51*, 735 (1954).

Summary

In 21 rabbits, the average concentration of sodium and potassium in the aqueous humor was found to be respectively 149 ± 4·3 mEq/l and 5·34 ± 0·39 mEq/l.

Eleven of these animals were injected with Diamox (100 mg/kg of body weight); a significant drop of potassium concentration in the aqueous humor was observed three hours later, as compared with the ten control animals. No change in sodium concentration occurred.

Our findings are considered in correlation with the fall of intraocular pressure produced by the carbonic anhydrase inhibitor, and the role of this enzyme is discussed.

Action d'un inhibiteur de la carboanhydrase, l'acétazolamide, sur l'excitabilité du cortex, du thalamus et du rhinencéphale

La carboanhydrase se trouve dans le système nerveux central de l'homme et de différentes espèces d'animaux[1], mais le rôle qu'elle y joue n'est pas connu. Or, nous possédons actuellement un inhibiteur spécifique de ce ferment, l'acétazolamide ou Diamox. A côté de son action diurétique, ce dérivé entraîne parfois chez l'homme quelques effets secondaires, tels que paresthésies et légère somnolence[2]. En outre, il exerce une influence favorable dans certains cas d'épilepsie[3]. Nous nous sommes donc proposés d'étudier chez l'animal l'action de l'acétazolamide sur différentes structures cérébrales.

Technique et matériel expérimental. Nos expériences furent effectuées chez des lapins non narcotisés de 2,5 à 3 kg. Après anesthésie locale et dénudation du crâne, un socle stéréotaxique est fixé sur la voûte, dans une position définie par rapport aux sutures – voir technique Monnier et Laue[4], Gangloff et Monnier[5]. Une série de perforations permet d'introduire dans le cerveau des électrodes de stimulation et de dérivation. A l'aide de ce dispositif, on peut stimuler le cortex, le noyau latéral du thalamus et le rhinencéphale; simultanément, on dérive les ripostes électriques de ces mêmes structures. Le stimulateur de Wyss nous a fourni une impulsion ayant la forme du potentiel d'action d'un nerf périphérique (durée de l'impulsion 7 ms, fréquence 40 c/s, durée de la salve 15 s). Nous avons déterminé le seuil d'excitabilité de chaque structure, en augmentant progressivement le voltage des stimuli jusqu'à l'apparition d'une after-discharge; cette dernière était enregistrée par un électro-encéphalographe de Grass.

Après détermination des paramètres de base (seuil d'excitabilité, durée et aspect qualitatif de l'after-discharge), 100 mg/kg d'acétazolamide ont été injectés par voie intraveineuse. Notre étude porte sur 14 lapins, dont 7 témoins n'ayant pas reçu de médicament. Chaque animal a été sacrifié à la fin de l'expérience. Nous avons pratiqué des coupes sériées dans le cerveau, pour dépister d'éventuelles lésions des structures stimulées. Ont été écartés systématiquement les résultats concernant les points lésés: ce fut le cas pour un point du rhinencéphale (cas 6) et pour un point du cortex (cas 7).

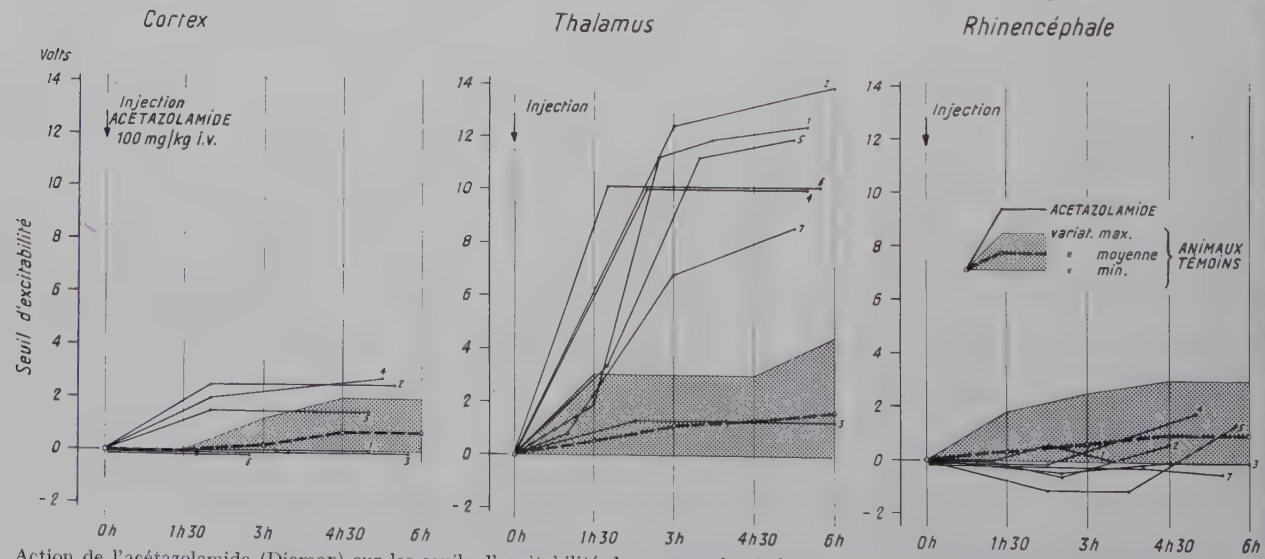
Résultats et discussion. Nous résumons par une figure les variations relatives des seuils d'excitabilité sous l'effet du Diamox, par rapport aux seuils initiaux. Ces variations sont comparées aux valeurs obtenues chez les animaux témoins.

a) *Cortex* (6 cas). Trois cas n'ont pas présenté de modifications notables du seuil d'excitabilité (1, 3, 6). Chez les 3 autres animaux, on observe une légère élévation du seuil cortical, qui n'excède guère les variations extrêmes observées dans les cas témoins.

b) *Thalamus* (7 cas). Six cas présentent une importante élévation du seuil d'excitabilité diencéphalique. Cet effet se manifeste assez rapidement: dans un cas, une heure après l'injection d'acétazolamide; il s'accentue encore par la suite.

c) *Rhinencéphale* (6 cas). Dans trois cas, le seuil d'excitabilité rhinencéphalique s'abaisse à peine après l'injection; il tend à remonter vers la fin de l'expérience. Chez trois autres animaux, le seuil est resté pratiquement stable.

La durée et l'aspect qualitatif de l'after-discharge, au niveau des trois structures stimulées, n'ont pas été modifiés d'une façon systématique par le Diamox.



Action de l'acétazolamide (Diamox) sur les seuils d'excitabilité du cortex, du thalamus et du rhinencéphale chez le lapin (7 cas), en comparaison avec des expériences témoins (7 cas). – Il s'agit de variations relatives par rapport aux seuils initiaux.

[1] W. Ashby et D. V. Cham, J. Biol. Chem. *151*, 515 (1943). – W. Ashby, R. F. Garzoli et E. M. Schuster, A. M. Physiol. *170*, 116 (1952).

[2] C. K. Friedberg, R. Taymor, J. B. Minor et M. Halpern, New England J. Med. *248*, 883 (1953). – A. Falbriard, Praxis *14*, 293 (1954).

[3] W. H. Bergstrom, R. F. Garzoli, C. Lombroso, D. T. Davidson et W. M. Wallace, Amer. J. Dis. Child. *84*, 771 (1952).

[4] M. Monnier et H. Laue, Helv. Physiol. Acta *11*, 73 (1953).

[5] H. Gangloff et M. Monnier, Tagung der Österreichischen Arbeitsgemeinschaft für E.E.G. Bad Ischl, septembre 1954 (à paraître dans Pflügers Arch. 1955).

Ainsi, l'action la plus frappante de l'acétazolamide consiste en une diminution de l'excitabilité du *diencéphale*. Dans l'interprétation de nos résultats, il est malaisé de faire la part de l'acidose sanguine que provoque le Diamox et d'une inhibition spécifique de la carboanhydrase cérébrale. Ce dernier mécanisme est suggéré notamment par l'action relativement précoce de la substance étudiée, de même que par son effet presque électif sur une structure cérébrale. Dans trois cas[1], nous avons mesuré le pH sanguin veineux en cours d'expérience, au moyen d'une «cup-electrode» de BECKMAN: le seuil d'excitabilité diencéphalique s'est élevé avant toute variation du pH sanguin. Cependant, on ne peut exclure complètement la participation de l'acidose, même compensée, dans l'action de l'acétazolamide sur le système nerveux.

Il serait intéressant d'établir des corrélations entre l'action sédative du Diamox sur l'excitabilité diencéphalique, que nous avons observée, et la répartition topographique de l'anhydrase carbonique cérébrale. Cependant, selon ASHBY, cette répartition est variable suivant chaque espèce animale et les éléments dont nous disposons, en ce qui concerne le lapin, portent sur un nombre de cas limité (1). Des données topographiques plus précises, confrontées avec les effets de l'acétazolamide, permettraient d'approfondir le rôle de la carboanhydrase dans le système nerveux central.

[1] Nous remercions vivement, pour sa précieuse collaboration, Monsieur A. ZEHNDER, chimiste, Laboratoire central de l'Hôpital cantonal.

A. FALBRIARD et H. GANGLOFF

Laboratoire de Neurophysiologie appliquée, Genève, et Clinique de Thérapeutique Universitaire de Genève, le 3 mars 1955.

Summary

The electrical activity induced by stimulation of the cortex, diencephalon and rhinencephalon was studied in the rabbit under the influence of a carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide or Diamox. A significant decrease of the excitability was found in the diencephalon.

The rapidity and the electivity of this action, as well as the blood pH variations simultaneously registered, suggest a specific inhibition of cerebral carbonic anhydrase by Diamox, although a participation of the metabolic acidosis cannot be fully excluded.

Actions de la néostigmine, du D.F.P. et du 3318 CT sur la sensibilité du rectus de grenouille aux esters acétique, propionique et butyrique de la choline

En 1933, CHANG et GADDUM[1] ont montré que l'ésérine sensibilise le rectus de grenouille aux trois esters, acétique propionique et butyrique de la choline; cet effet est classiquement attribué à une inhibition des cholinestérases. Toutefois, depuis cette date, les problèmes relatifs aux enzymes hydrolysant les esters de choline sont devenus très complexes: en particulier, il a été montré (cf. WHITTAKER[2]) que les trois esters cités ne sont pas, *in vitro*, hydrolysés par les mêmes estérases, l'acétylcholine l'étant surtout par les cholinestérases «vraies» (acétylcholinestérases, AcChE), les propionyl- et butyrylcholines surtout par des «pseudo»-cholinestérases (*X*ChE). En outre, des phénomènes de sensibilisation, indépendants d'une inhibition enzymatique, ont été décrits par divers auteurs (cf RIKER[1]).

Il nous a semblé utile de reprendre l'étude des potentialisations de ces trois esters en mettant en œuvre des agents anticholinestérasiques de types différents et en comparant ces potentialisations à celle d'un sel d'ammonium quaternaire non hydrolysable, l'amyltriméthylammonium.

Les inhibiteurs utilisés sont: la néostigmine qui inactive indifféremment la plupart des cholinestérases, le diisopropylfluorophosphate (D.F.P.) qui inhibe préférentiellement les *X*ChE, et le diiodométhylate de la bis-(pipéridinométhylcoumaranyl-5)-cétone (3318 CT), agent anti-AcChE sélectif décrit dans des notes antérieures de ce Laboratoire[2].

Les effets de la néostigmine sont illustrés par la Figure 1. Comme l'ésérine, cet agent potentialise les trois esters étudiés; aucune différence nette n'apparaît entre la sensibilisation à l'acétylcholine et celle à la propionylcholine, mais la butyrylcholine est moins affectée que ses deux homologues inférieurs. Cette potentialisation de la butyrylcholine est cependant beaucoup plus importante que l'accroissement de l'action de l'amyltriméthylammonium et résulte donc, comme celle des deux autres esters, essentiellement d'inhibitions enzymatiques. Dans ces essais, comme dans ceux de CHANG et GADDUM, la propionylcholine est le plus efficace des agents contracturants étudiés.

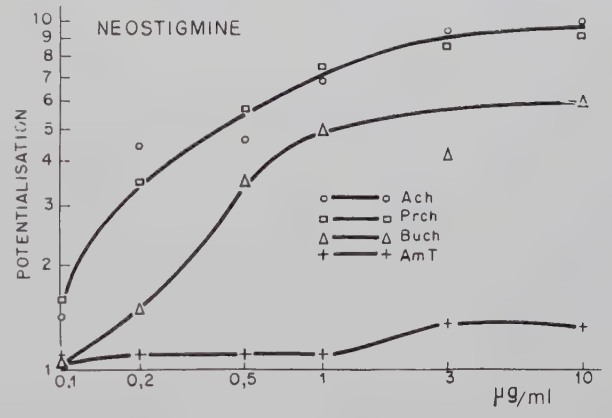


Fig. 1. En abscisse: Concentrations de Néostigmine en μg/ml (échelle logarithmique). En ordonnée: Potentialisation exprimée par le rapport des doses provoquant une contracture d'environ 50% avant et après administration de l'anticholinestérasique (échelle logarithmique): ○——○ Acétylcholine (chlorure); □——□ Propionylcholine (bromure); △——△ Butyrylcholine (bromure); +——+ Amyltriméthylammonium (iodure). Chaque point correspond à la moyenne d'au moins trois essais.

Le D.F.P. (Fig. 2) différencie très nettement la butyrylcholine des deux autres esters; la butyrylcholine est potentialisée par les faibles concentrations (1 μg et 3 μg/ml) de cet inhibiteur et la sensibilisation ne progresse plus si on accroît la dose de D.F.P.; les deux autres esters sont seulement potentialisés à partir de 5 μg/ml, mais le phénomène progresse avec des concentrations de D.F.P. croissant jusqu'à 100 μg/ml; pour

[1] H. C. CHANG et J. H. GADDUM, J. Physiol. *79*, 255 (1933).
[2] V. P. WHITTAKER, Physiol. Rev. *31*, 312 (1951).

[1] W. F. RIKER, Pharmacol. Rev. *5*, 1 (1953).
[2] A. FUNKE, J. JACOB et K. VON DÄNIKEN, C. r. Acad. Sci. *236*, 149 (1953). – J. JACOB et A. FUNKE, C. r. Acad. Sci. *237*, 1809 (1953). – J. JACOB, Exper. *10*, 33 (1954); Arch. Int. Pharmacodyn. (sous presse).

les doses supérieures les diverses potentialisations rétrocèdent. Comme avec la néostigmine, la sensibilisation maximale observée pour la butyrylcholine est inférieure à celle qui peut être obtenue pour l'acétyl et la propionylcholine. Encore une fois, la potentialisation de l'amyltriméthylammonium est de loin inférieure à celle des esters; à partir de 5 μg/ml de D.F.P., elle fait place à un antagonisme modéré. Bacq[1] avait déjà signalé l'effet dépresseur des fortes concentrations de D.F.P.

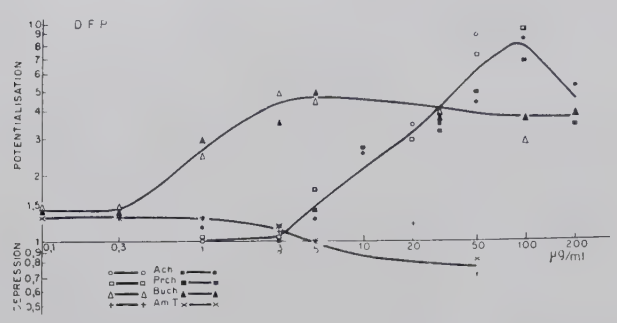


Fig. 2. En abscisse: Concentrations de D.F.P. en μg/ml (échelle logarithmique). En ordonnée: Potentialisation exprimée par le rapport de doses provoquant une contracture d'environ 50% avant et après administration de l'anticholinestérasique (échelle logarithmique): ○—○ Acétylcholine; □—□ Propionylcholine; △—△ Butyrylcholine; +—+ Amyltriméthylammonium. Figurent également les rapports des effets obtenus avec une même dose d'agent contracturant avant et après administration de l'anticholinestérasique: ●—● Acétylcholine; ■—■ Propionylcholine; ▲—▲ Butyrylcholine; ×—× Amyltriméthylammonium.

Le 3318 CT (Fig. 3) ne sensibilise pas le rectus à la butyrylcholine; pour toutes les doses étudiées on observe, au contraire, un antagonisme qui est quantitativement semblable à celui exercé vis à vis de l'amyltriméthylammonium. Par contre, les esters acétique et propionique sont potentialisés, faiblement en valeur absolue, fortement si l'on tient compte de l'interférence de l'effet dépresseur; ce dernier correspond vraisemblablement à l'activité curarisante qu'exerce le 3318 CT sur la transmission neuromusculaire du chat[2].

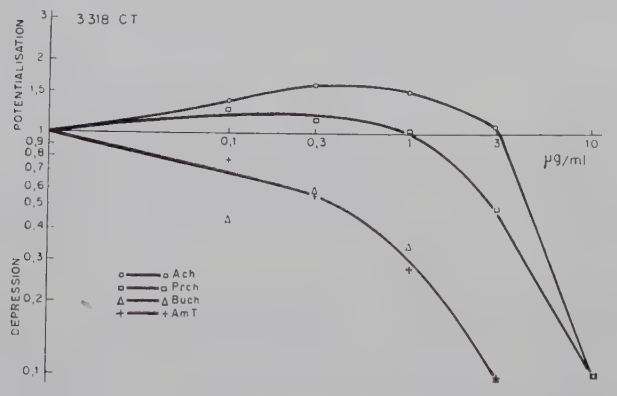


Fig. 3. En abscisse: Concentrations de 3318 CT en μg/ml (échelle logarithmique). En ordonnée: Potentialisation et dépression exprimées par les rapports de doses provoquant une contracture d'environ 50% avant et après administration de l'anticholinestérasique (échelle logarithmique) ○—○ Acétylcholine; □—□ Propionylcholine; △—△ Butyrylcholine; +—+ Amyltriméthylammonium. Chaque point correspond à la moyenne d'au moins trois essais.

[1] Z. M. Bacq, C. r. Soc. Biol. *141*, 857 (1947).
[2] J. Jacob, Exper. *10*, 496 (1954).

Dans des expériences complémentaires nous avons observé que:

1° après de faibles doses (3–5 μg/ml) de D.F.P., le 3318 CT exerce les mêmes effets que sur le rectus normal. Après de fortes concentrations de D.F.P. le 3318 CT antagonise les trois esters; il en est de même après néostigmine.

2° après 3318 CT, le D.F.P., à faibles doses, potentialise nettement la butyrylcholine mais peu ou pas les deux autres esters; il en est de même pour la néostigmine à ceci près qu'une potentialisation modérée de la propionylcholine apparaît plus fréquemment. D'autre part, les concentrations élevées de D.F.P. (100 μg/ml) qui, normalement, potentialisent les acetyl- et propionylcholines, les antagonisent après 3318 CT.

Cet ensemble de faits est le plus simplement interprété en admettant que la butyrylcholine est essentiellement hydrolysée par une *X*ChE, les acétyl- et propionylcholines par un ou des enzymes appartenant à la catégorie des AcChE; rien ne permet de penser – au contraire toutes nos observations s'y opposent – que les AcChE puissent intervenir, même à titre palliatif, dans l'hydrolyse de la butyryl-choline qui est potentialisée de façon maximale par les faibles doses de D.F.P. Dans le cas de l'acétylcholine, et surtout de la propionylcholine, une intervention palliative des XChE, en tout état de cause modérée, ne peut pas être exclue avec certitude.

Dans le cadre de cette interprétation on serait conduit à considérer que la spécificité des enzymes, observée *in vitro* pour des concentrations relativement élevées d'un ester déterminé de la choline, est valable également, *in vivo*, pour les doses pharmacologiquement actives de ces substances: pareille conclusion ne serait cependant valable que pour le cas simple considéré, celui du rectus isolé car, chez l'animal in toto et tout au moins pour certaines actions de l'acétylcholine, les faits apparaissent d'interprétation beaucoup plus malaisée (cf. Heymans, Verbeke et Votava[1]; Koppanyi, Karczmar et Sheatz[2]; Jacob[3]).

Enfin, il est curieux de constater que le comportement de la propionylcholine est, dans ces expériences, sinon superposable, tout au moins très voisin de celui de l'acétylcholine. Ce comportement nous paraît être d'autant plus intéressant que la nature physiologique de la propionylcholine a été récemment démontrée (Bannister, Whittaker et Wijesundera[4]; Gardiner et Whittaker[5]) et que cet ester est plus efficace que l'acétylcholine sur le rectus normal ou prostigminisé (ou ésérinisé), ce qui pourrait signifier qu'il s'adapte aux «récepteurs» de cet organe de façon plus adéquate.

J. Jacob et M. Dechavassine

Laboratoire de Pharmacologie, Service de Chimie Thérapeutique, Institut Pasteur Paris, le 22 janvier 1955.

Summary

The potentiating effects of Neostigmine, D.F.P. and 3318 CT (a selective "true" cholinesterase inhibitor) on acetylcholine (ACh), propionylcholine (PrCh), butyrylcholine (BuCh) and amyltrimethylammonium (AmT), have been studied using the frog's rectus abdominis.

[1] C. Heymans, R. Verbeke et Z. Votava, Arch. Int. Pharmacodyn. *77*, 486 (1948).
[2] T. Koppanyi, A. G. Karczmar et G. C. Sheatz, J. Pharmacol. *107*, 482 (1953).
[3] J. Jacob, Exper. *10*, 33 (1954).
[4] J. Bannister, V. P. Whittaker et S. Wijesundera, J. Physiol. *121*, 55 (1953).
[5] J. E. Gardiner et V. P. Whittaker, Biochem. J. *58*, 24 (1954).

Neostigmine increases the actions of the three esters much more than that of AmT. Low concentrations of D.F.P. potentiate maximally BuCh but have practically no effect on ACh, PrCh, and AmT. 3318 CT potentiates AcCh and PrCh but inhibits BuCh and AmT.

These results indicate the specificity of the hydrolysis of pharmacologically active doses of BuCh, on the one hand, of AcCh and PrCh, on the other hand, by different enzymes of the frog's rectus.

Results obtained with high concentrations of D.F.P. and with association of the different anticholinesterases indicate that a maximal or nearly maximal potentiation of one of these esters is already obtained with the specific inhibitor concerned; the supplementary inhibition of the non-specific enzymes thus appears to have no or only a poor effect.

Die C-17-Ketosteroidausschüttung nach Gaben von Äthanol und Wein

Orale Gaben von Weisswein, nicht aber von gleichen Mengen Äthanol, führen im Tierversuch zu einer «progressiven Transformation»[1], einer statistisch signifikanten Vergrösserung der Zellkerne im Faszikulatagebiet der Nebennierenrinde (NNR.)[2]. Diese morphologischen Veränderungen sind nicht nur Ausdruck einer vermehrten Bereitstellung sekretionstauglichen Gewebes, sondern bedeuten einen entsprechend veränderten Funktionszustand[3]. Laves[4] beobachtete mit dem Thorntest einen Antagonismus zwischen Alkohol (Weinbrand) und Cortison. Das Ausmass dieses Antagonismus wurde entsprechend früheren Untersuchungen[5] über die Äthanolempfindlichkeit durch den Konstitutionstypus der Probanden beeinflusst.

Die C-17-Ketosteroidausschüttung (KSt.) nach Gaben von Wein und Äthanol wurde nicht beschrieben. Zur Untersuchung dieser Frage wählten wir die Zimmermannsche Methode[6] und männliche Ratten von 140 bis 160 g in früher beschriebener Weise[3]. Bei $n = 30$ betrug im Leerversuch die mittlere Ausscheidung 40,1 γ KSt./Tier/Tag, bei einem wahrscheinlichen mittleren Fehler von $\pm$ 7,5% ($3\,\sigma = 22{,}5\%$).

Gruppen von je 3 Tieren erhielten täglich zweimal je 5 cm³ Weisswein mit der Schlundsonde verabreicht (Versuch 1). Die KSt.-Bestimmung erfolgte täglich. In Versuch 2 wurde die äquivalente Menge Äthanol in demselben Volumen gegeben (12%). Die Tiere von Versuch 3 erhielten nur am 1. Tag im Abstand von 4 h zweimal 5 cm³ Weisswein.

Einmalige oder protrahierte Weingaben bewirken danach eine statistisch signifikante Erhöhung der KSt.-Ausschüttung. Bei alleiniger Applikation am 1. Tag sind die Werte bis zum 2. Tag wieder zur Norm abgesunken. Dieses Ergebnis stimmt mit der früher gemachten Feststellung einer progressiven Transformation der Faszikulatakerne der NNR. nach Weingaben überein. Dagegen bewirkt die tägliche Verabreichung gleich grosser Mengen Äthanol keinen Anstieg der KSt.-Ausschüttung. Alle Werte bewegen sich im Normbereich. Dieses Resultat entspricht insofern demjenigen von

C-17-Ketosteroid-Ausscheidung nach Gaben von Wein

Tage nach Versuchsbeginn	Täglich zweimal 5 cm³ Wein		Zweimal 5 cm³ Wein am 1. Versuchstag	
	Abweichung der KSt.-Ausscheidung in Prozent vom normalen Mittelwert			
	1. Serie	2. Serie	1. Serie	2. Serie
1	+ 62,4	+ 74,3	+ 50,1	+ 54,2
2	+ 60,1	+ 52,6	+ 11,0 N	+ 2,8 N
3	+ 66,0	+ 70,1	+ 3,3 N	+ 0,3 N
4	+ 52,6	+ 64,5	–	–
5	+ 53,2	+ 52,7	–	–

C-17-Ketosteroidausscheidung nach Gaben von Äthanol

Tage nach Versuchsbeginn	Absolute KSt.-Werte in γ/Tier/Tag	
	1. Serie	2. Serie
1	+ 37,4	+ 40,3
2	+ 42,0	+ 38,0
3	+ 40,4 N.	+ 35,8 N.
4	+ 38,8	+ 42,2
5	+ 38,0	+ 36,8

N. = Normbereich

Laves[1], als auch bei unseren Versuchen keine Stressreaktion deutlich wurde. Allerdings liess sich mit dieser Methode eine statistisch signifikante Unterschreitung des Normbereichs nicht darstellen, wie es nach den Versuchen von Laves zu erwarten gewesen wäre. Eine weitere Abklärung ist mit dieser Methode unter Verwendung eines Antagonisten denkbar.

H. Kliewe und G. Gillissen

Hygiene-Institut der Universität Mainz, den 7. Februar 1955.

Summary

Single or repeated doses of wine result in a statistically significant rise of excretion of C-17-Cetosteroids. After application of the same quantity of ethylalcohol, this effect was not seen. These results can be correlated with former observations on the changes of the nuclei-volumes of the zona fasciculata.

[1] W. Laves, loc. cit.

Der Antagonismus von schwefliger Säure und Äthanol im Hinblick auf die NNR.-Funktion

Orale Gaben von Weisswein bewirken im Gegensatz zu äquivalenten Mengen Äthanol einen statistisch signifikanten Anstieg der Ausscheidung von C-17-Ketosteroiden (KSt.)[1]. Nicht geklärt ist die Frage nach den wirksamen Weinbestandteilen. In Tierversuchen mit männlichen Ratten von 120 bis 140 g wurde, wie früher beschrieben[1], die tägliche Ausscheidungsgrösse von KSt. nach oralen Gaben von schwefliger Säure bestimmt. In Leerversuchen ($n = 30$) betrug die mittlere Ausscheidung 40,1 γ KSt./Tier/Tag bei einem wahrscheinlichen mittleren Fehler von $\pm$ 7,5% ($3\,\sigma = 22{,}5\%$).

Jedes der 3 Tiere einer Gruppe erhielt am 1. Tag im Abstand von 4 h zweimal 5 cm³ einer wässrigen Lösung von 50 mg SO_2/l (die in Deutschland für Wein erlaubte Höchstkonzentration an freier schwefliger Säure) oral

[1] H. Kliewe und G. Gillissen, Exper. *11*, 237 (1955).

[1] W. Boguth, H. Langendorff und E. Tonutti, Med. Welt *13*, 408 (1951).

[2] G. Gillissen, Z. Hyg. *135*, 341 (1952).

[3] G. Gillissen und A. Merschkötter, Zbl. Bakter. I. Orig. *160*, 239 (1953).

[4] W. Laves, Arch. exp. Path. Pharmakol. *222*, 482 (1954).

[5] W. Laves, Beitr. gerichtl. Med. *19*, 86 (1952). – A. Tintera und H. Lovell, Dig. Neurol. Psychiatr., Hartford *17*, 521 (1949).

[6] W. Zimmermann, Z. physiol. Chem. *245*, 47 (1936).

mit der Schlundsonde verabreicht. Die KSt.-Bestimmung erfolgte täglich bis zu 5 Tagen.

Tabelle I. Einfluss von schwefliger Säure auf die C-17-Ketosteroidausscheidung

Tage nach Versuchsbeginn	Zweimal 5 cm³ SO_2 (50 mg/l) am 1. Tag Abweichung der KSt.-Ausschüttung in Prozent vom normalen Mittelwert	
	1. Serie	2. Serie
1	– 17,4 N.	– 1,2 N.
2	+ 100,2	+ 94,7
3	– 0,2 N.	+ 4,0 N.
4	– 4,0 N.	+ 5,2 N.
5	– 1,0 N.	+ 6,5 N.

N. = Normbereich

Schweflige Säure bewirkt demnach an dem auf die Applikation folgenden Tag einen deutlichen Anstieg der KSt.-Ausscheidung.

Da Äthanol allein die KSt.-Ausschüttung nicht erhöht, nach den Untersuchungen von Laves[1] aber einen Cortisoneffekt bremst, wurde den Versuchstieren am 1. Versuchstag zweimal 5 cm³ einer 12%igen Lösung von Äthanol in schwefliger Säure (50 mg SO_2/l) wie oben oral verabreicht und täglich die KSt.-Ausscheidung gemessen.

Tabelle II. C-17-Ketosteroidbestimmung nach Gaben von Äthanol und schwefliger Säure

Tage nach Versuchsbeginn	Abweichung der KSt.-Ausscheidung in Prozenten vom normalen Mittelwert	
	1. Serie	2. Serie
1	– 31,4	– 29,2
2	+ 23,0	+ 24,4
3	+ 8,7 N.	+ 7,5 N.
4	+ 4,0 N.	+ 4,5 N.
5	– 6,0 N.	+ 0,3 N.

N. = Normbereich

Die gleichzeitige Gabe von Äthanol und schwefliger Säure führt anfänglich zu einer geringen, den Normbereich unterschreitenden KSt.-Ausscheidung. Am 2. Versuchstag liegen die Werte dann wenig über dem Normbereich. Da nach den früheren Beobachtungen orale Weingaben zu einer deutlichen Mehrausschüttung führen – ein Ergebnis, das in keinem Verhältnis zu den oben wiedergegebenen Werten steht –, müssen noch andere Faktoren als schweflige Säure für den Stresseffekt verantwortlich sein. Andererseits ist aus den oben beschriebenen Versuchen zu entnehmen, dass Äthanol den durch Gaben von schwefliger Säure hervorgerufenen Stresseffekt bremst. Dieses Resultat steht in Einklang mit demjenigen von Laves[1] über den Antagonismus von Äthanol und Cortison.

H. Kliewe und G. Gillissen

Hygiene-Institut der Universität Mainz, den 7. Februar 1955.

Summary

Ethanol lessens the stress effect which is produced by application of sulphureous acid.

[1] W. Laves, Arch. exp. Path. Pharmakol. *222*, 482 (1954).

On the Vasopressor and Antidiuretic Activities of Synthetic Oxytocin

Du Vigneaud and his co-workers[1] identified their synthetic product with the natural oxytocic principle in different tests, such as: fowl blood-pressure, rat uterus test, induction of labour in humans, and finally milk ejecting action. The question of whether hypophysis posterior-lobe hormones are similar or identical agents and whether the differences existing between them are of qualitative or quantitative nature, has been widely discussed in the literature. As a result of newer investigations[2], the oxytocic and vasopressor peptides are found to differ from each other in their amino acid contents, lysine or arginine being characteristic for the vasopressor hormone. This statement led us to the question of idea whether interconnection may exist between the presence of the amino acids mentioned above and the vasopressor activity.

In order to clear up this question, we examined a sample of oxytocic octapeptide synthesized according to Du Vigneaud's method for its vasopressor and antidiuretic activities. (This preparation was not subject to Craig's counter-current purification process.) As standard was chosen the posterior-lobe extract standard powder of the State Institute for Public Health, Budapest, which is assayed by the guinea-pig uterus method. Determination of the vasopressor activity was carried out on decapitated cats (four point assay) that of the antidiuretic activity on rats (six point assay)[3]. The oxytocic activity of the preparation was measured by the fowl blood-pressure method.

The synthetic oxytocin examined proved to have an antidiuretic activity of 0·067 ± 0·00825 (S.E.) U. for each oxytocic unit (mean of 4 experiments) and a vasopressor activity of 0·032 ± 0·0031 (S.E.) U. for each oxytocic unit. (Mean of 6 experiments.) The difference between these two relative values is statistically significant ($p < 0{\cdot}01$).

We conclude, therefore, that the vasopressor and antidiuretic activities of the synthetic oxytocin which measured about 1/15 to 1/30 of the oxytocic activity concerned are independent of the arginine or lysine content of such polypeptides. Our results are not in accordance with those of Lawler and Du Vigneaud obtained with a purified natural oxytocin; their preparation had an antidiuretic activity of less than 0·001 U./oxytocic unit and was entirely lacking in vasopressor activity[4]. On the other hand, purified arginine and lysine vasopressins show a 1/6–1/20 oxytocic activity according to the test employed.

On the grounds of these facts, we must assume that either the identity of the synthetic and natural oxytocin still remains questionable, or that the different quantitative and qualitative activity-relations between the posterior-lobe hormone are not yet clearly determined, in spite of the possession of synthetic products.

The authors are greatly indebted to Drs. M. Bodánszky, M. Szelke, A. Tömörkény, and E. Weiss who have prepared and supplied the synthetic oxytocin used in these experiments.

L. Gyermek and Gy. Fekete

Department of Pharmacology, Pharmaco-industrial Research Institute Budapest, January 30, 1955.

[1] V. du Vigneaud, C. Ressler, I. M. Swan, C. W. Roberts, and J. Katsoyannis, J. Amer. Chem. Soc. *76*, 3115 (1954).

[2] C. H. Lawler, V. Du Vigneaud, and E. A. Popenoe, J. Amer. Chem. Soc. *75*, 48, 80 (1953).

[3] J. H. Burn, *Biological Standardization* (Oxford, 1950).

[4] C. H. Lawler and V. Du Vigneaud, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *84*, 114 (1953).

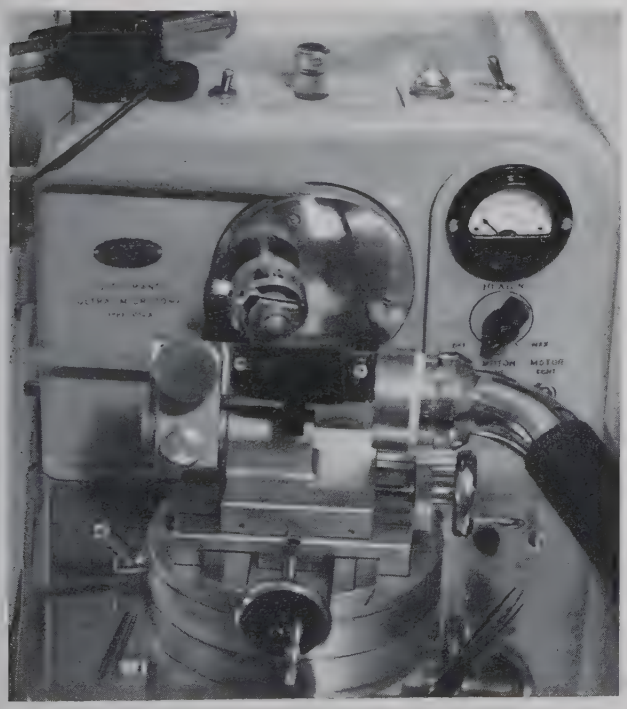
Zusammenfassung

Synthetisches Oxytozin hat auch vasopressorische und antidiuretische Wirkungen, die etwa 1/30 und 1/15 der oxytozischen Aktivität ausmachen. (Hochgereinigte natürliche Oxytozin-Präparate haben nach LAWLER und DU VIGNEAUD kaum solche Eigenschaften.) Die Differenz zwischen synthetischem und hochgereinigtem Oxytozin weist in dieser Hinsicht darauf hin, dass diese nicht identisch wären.

PRO EXPERIMENTIS

Larger Section Areas for Electron Microscopy by Aid of Ultrasonics

Well established section techniques for 200 Å section thickness in electron microscopy (SJÖSTRAND[1], *inter alia* 1954) require a careful treatment of the object block to prepare a small cone for sectioning. In rare cases it is desirable to increase the section area, particularly when very large cells are concerned e.g. the salivary gland cells of *chironomus*. To proceed 50 μ into the tissue structure perpendicular to the level of the first section, about 2500 sections have to be cut, even though only about 10% of such series are actually studied in the electron



microscope. If the ratio of the size of the object of interest – the tissue detail – to the tissue volume is very low, large survey sections seem to be of greater advantage than many small sections into the depth of the tissue. Because section quality rapidly decreases when the section area is increased, an ultrasonic generator was fitted to the knife holder of a SJÖSTRAND microtome (Figure) vibrating the knife in a transversal direction, thus allowing one to section up to 1·5 mm² blockface area without endangering the section quality. Unavoidable oscillations of the knife toward and away from the object block had no visible influence on section smoothness. Obviously the magnitude of such vibration effects do not exeed the practical resolution power of the electron microscope. The figure demonstrates the arrangement at the microtome. On the right side can be seen the handle with the vibration head (Sonostat 812, Siemens-Reiniger, Erlangen), which generates 800 Khz at – for our purpose – 1 watt/cm². The vibration head is held by a brass cup in which contact of the vibrating surface and the cup bottom is effected by a layer of thick oil. The brass cup in turn is tightly screwed on to the knife holder.

The above described arrangement seems to be advantageous even when harder materials are to be sectioned. We are indebted to the Elema Company, Stockholm, for kindly putting the Sonostat at our disposal.

G. F. BAHR

Institute for Cell Research and Genetics, Karolinska Institutet, Stockholm, February 2, 1955.

Zusammenfassung

Um in besonderen Fällen die Schnittflächengrösse in der Schneidetechnik für die Elektronenhistologie erhöhen zu können, wurde mit Erfolg das Mikrotommesser in seiner Längsachse in Ultraschallschwingungen versetzt.

PRO EXPERIMENTIS

A Modified Petri Dish Method for Rust Infection of Excised Leaves

The use of Petri Dishes for culturing rust fungi on detached leaves has been recommended and attempted by many investigators with varying degree of success. The literature on detached leaf culture in all its aspects has been reviewed by YARWOOD[1]. Depending upon the purpose of investigation numerous variants of the Petri dish method have been suggested. CRAIGIE[2] used the method of suspending the infected plant parts (culms, leaves, twigs, etc.) over the healthy host plants for demonstrating heterothallism in rust fungi. The writer has used with moderate success a modification of CRAIGIE's method by using detached leaves in Petri dishes. He has studied the sex behaviour of rust fungi like *Scopella gentilis* (Syd.) Mund. and Thirum. on *Mimusops hexandra* Roxb. (Sapotaceae) and *Puccinia thwaitesii* Berk. on *Justicia gendarussa* Burm. (Acanthaceae) by this modified Petri dish method. As far as the writer is aware the method of using excised leaves in Petri dishes for studying sex-behaviour of rust fungi has not been attempted so far.

Leaves of the plant of which the rust is to be studied are preferably detached in the afternoon so that the carbohydrate, protein and mineral contents may be higher and the leaves consequently may remain in fresh condition longer (YARWOOD[1]). The rusted leaves are collected earlier for testing the viability of the teliospores

[1] F. S. SJÖSTRAND, Z. wiss. Mikroskop. *62*, 65 (1954).

[1] C. E. YARWOOD, Bot. Rev. *12*, 1 (1946).

[2] J. H. CRAIGIE, Phytopathology *21*, 1013 (1931).

(in case of *Puccinia thwaitesii* the teliospores on maturity germinate within 6 h). The rusted leaves are then soaked in water for 2 to 3 h. To the lids of Petri dishes such infected and water-soaked leaf material is stuck at both ends by means of melted paraffin or any other suitable adhesive in such a way that the telia project downwards (Fig. 1). In the other half of the Petri dish the washed and moist healthy leaves are kept supported by wood blocks or by any other means of support like rubber bands, built-in notches in Petri dishes (Clinton and McCormick[1]), paraffin-coated circular discs of wire-screen with bent edges (Waters[2]), etc. The upper surfaces of the healthy leaves should face the lower sides of the stuck infected leaves if the telia are hypophyllous for the basidiospores penetrate directly through the epidermis of the upper leaf surface. Care must be taken that the healthy leaves in the lower half of the dish and the stuck infected material on the lid of the Petri dish do not come in contact with one another.

The healthy leaves are sprayed with an atomizer. The bottom of the Petri dish is just sufficiently covered with distilled water. The stuck infected material is then set in position over the lower half of the dish (Fig. 1). In this method also, like that of Craigie[3], advantage is taken of the forcible discharge of the basidiospores. After 6 to 8 h sporidial shower occurs. During this period the lids can be rotated for obtaining scattered pustules on different regions of the leaf or leaves. If the leaves are longer than the diameter of the Petri dish they can be trimmed to the required length with petioles always intact. Normally after a period of 48 h the stuck infected leaves are removed, the lids cleaned thoroughly and replaced in position. The dishes are then kept near a laboratory window in diffused light. Water in the Petri dishes has to be changed every alternate day, if not daily. The inoculated leaves also should be periodically sprayed with water.

If the leaves selected are very young, infection manifests itself after 6 days of inoculation in case of *Puccinia thwaitesii*. If, however, the leaves are not very young and have already matured, i.e., they have developed a thick cuticle, the infection is slow in appearance. For pustules to appear on such leaves a period of 12 to 15 days is necessary.

When the experiment is in progress an interesting phenomenon may occur. It is the formation of callus at the petioles resulting in rooting of the leaves (Fig. 2). This phenomenon, according to Mullan[1], is very common in certain members of Acanthaceae including *Justicia gendarussa* – the host of *Puccinia thwaitesii*. In the writer's experiments such rooted leaves lasted up to 60 days. The rust pustules could be maintained for about 42 days.

Waters[2] found in case of the bean rust (*Uromyces appendiculatus* Fries) that if only sterile distilled water was used for floating the leaves, the pustules became weakened in vigour. If, on the other hand, 5% sucrose solution was used the pustules developed very vigorously, thereby killing the leaves early. However, when the leaves were first kept in distilled water and then in sucrose solution, normal development of the pustules occurred. The writer has used only distilled water. Sucrose solution was found to hasten the contamination of the leaves with fungi and bacteria.

One difference was noted between the pustules of *Puccinia thwaitesii* occurring in nature and those obtained experimentally on excised leaves in Petri dishes. In nature, rust pustules having a diameter of 5 to 20 mm are quite common and in exceptional cases even the entire lamina may get plastered with telia. It may be the result of infection taking place early on very young leaves at which stage they are very susceptible. In Petri dishes, on the other hand, because of chance selection of somewhat mature leaves, probably only limited infection took place. It may also be due to the fact that monosporidial infections are not usually so vigorous in development as are the multisporidial ones. The pustules were just barely visible as minute (2 to 4 mm diameter), raised or depressed spots. On each pustule occasionally only one telium developed. However, the fact that single pustules produced telia shows that the rust is homothallic.

Advantages of the Petri dish Method. (1) Ease in operation, handling, and observation. (2) Requiring minimum amount of material. (3) Possibility of studying sex-behaviour of rust fungi without having recourse to potted plants. (4) Greater accuracy in counting, measuring, and classifying rust pustules in their initial as well as latter stages as simple, compound, mono-, bi-, or multi-sporidial. If necessary, the leaves can be carefully taken out of the Petri dishes and their surfaces examined at higher magnifications under a stereoscopic microscope. (5) Ease and accuracy in keeping track of individual pustules up to the time the experiment lasts.

[1] G. P. Clinton and F. A. McCormick, Conn. Agric. Expt. Sta. Bulletin *260*, 475 (1924).

[2] C. W. Waters, Phytopathology *18*, 157 (1928).

[3] J. H. Graigie, loc. cit.

[1] D. P. Mullan, J. Indian Bot. Soc. *10*, 167 (1931).

[2] C. W. Waters, Papers Michigan Acad. Sci., Arts and Letters *5*, 163 (1925).

Disadvantages of the Petri dish Method. (1) The survival of the leaves for a time long enough to complete observations on the rust infection is not always assured. (2) The exact environments as obtained in nature for the best development of any given rust fungus are not simulated to the fullest extent.

Acknowledgments.–The writer is indebted to the late Prof. S. L. Ajrekar and Dr. M. J. Thirumalachar for their kind advice. Acknowledgments are also due to Dr. S. P. Agharkar, Director, Botany Laboratory, Maharashtra Association for the Cultivation of Science, Poona, for providing laboratory facilities and useful suggestions.

M. M. Payak[1]

Botany Laboratory of M.A.C.S., Law College Building, Poona (India), January 25, 1955.

Zusammenfassung

Es wird eine Methode beschrieben, um festzustellen, ob ein Rostpilz homo- oder heterothallisch ist. Hiefür wird der Pilz auf einem geeigneten Medium in einer Petri-Schale gezüchtet. Die Vor- und Nachteile dieser Methode werden erörtert.

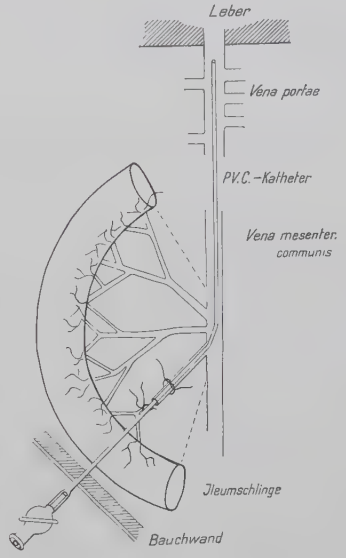
[1] Junior Research Fellow of the National Institute of Sciences of India.

PRO EXPERIMENTIS

Eine Methode zur fortlaufenden Blutentnahme aus der Vena portae von Hunden

Ausser der von Dent und Schilling[1] wiederverwendeten Londonkanüle und dem von Bessmann, Magnes und Waelsch[2] durchgeführten Einbinden einer T-Kanüle in die Vena portae von anästhesierten Katzen hat sich vor allem die Methode von Denton, Gershoff und Elvehjem[3] zur Gewinnung von Portalblut als sehr geeignet erwiesen. Die Autoren punktierten die Vena portae von Hunden und schoben durch die Punktionsnadel einen silikonüberzogenen «Genflex plastic»-Katheter bis in Lebernähe vor. Das Gefäss wurde durch eine Tabaksbeutelnaht und das Aufnähen von Mesenterium abgedichtet. Aus dem unter der Haut bis in den Nacken der Tiere verlegten Katheter war bis zu 8 Wochen eine Blutentnahme möglich. Als technisch schwierig ist bei der Methode nur das blutungssichere Einbringen des Katheters in die Portalvene anzusehen. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, verbesserten wir ein an Ratten erprobtes Verfahren für Versuche an Hunden.

Wir eröffneten in Urethan-Chloralosenarkose (0,75 g Urethan + 55 mg Chloralose/kg i.v.) das Abdomen mit einem Medianschnitt und lagerten die zweitletzte Ileumschlinge vor. In eine Mesenterialvene, die das Blut aus einem höchstens 4 cm langen Darmstück ableitete, wurde ein Polyvinylchlorid (PVC.)-Katheter eingeführt und durch die Vena mesenterica communis bis in die Vena portae vorgeschoben. Der meistverwendete, relativ grosskalibrige PVC.-Schlauch (innerer ⌀ 1 mm, äusserer ⌀ 2 mm) liess sich nach Punktion der Vene mit einer scharfen Injektionskanüle ohne Spritzenansatz durch die Kanüle leicht in das Gefäss einbringen. Zusammen mit der benutzten Mesenterialvene unterbanden wir die begleitende Arterie in beiden Richtungen von der Eingangsstelle, um eine, wenn auch nur vorübergehende, venöse Stauung des betroffenen Darmabschnittes auszuschliessen. Der Katheter wurde damit gleichzeitig am Mesenterium fixiert. Die Lage des PVC.-Schlauches in der Vena portae kontrollierten wir durch Palpation. Zur Blutentnahme wurde das Schlauchende seitlich von der Schnittwunde aus der Bauchhöhle geleitet und mit einem Zweiweghahn für Rekordspritzen armiert. Im Peritonealraum verblieb ausser dem in den Gefässen liegenden PVC.-Schlauch ein etwa 15–20 cm langes Schlauchstück, durch das Zerrungen am Mesenterium bei Darmbewegungen vermieden werden sollten. Am Ende der Operation wurde die Bauchdecke in 3 Schichten geschlossen und zur Infektionsprophylaxe eine



0,25 g-Dosierung Combiotic[1] i.m. injiziert. Die Abbildung gibt die Lage des Katheters schematisch wieder. Wegen der relativ kurzen Versuchsdauer von 2 bis 3 Tagen verzichteten wir auf die subkutane Verlegung des Katheters und befestigten ihn lediglich mit Heftpflaster so, dass der Zweiweghahn auf den Rücken des Tieres zu liegen kam und dort nochmals mit einer besonderen Pflasterlasche abgedeckt werden konnte.

An 4 mit dieser Methode vorbereiteten Hunden im Gewicht von 10 bis 17 kg unternahmen wir insgesamt 8 Verdauungsversuche mit verschiedenen Milchproben, davon 3 an narkotisierten und 5 an wachen Tieren. Die Kontrolle der Verdauungs- bzw. Resorptionsprodukte erfolgte durch stündliche Blutentnahme aus der Vena portae. Nach jeder Blutentnahme wurde der Katheter mit einer verdünnten Thrombocidlösung[1] blutleer gespült. Über die Ergebnisse dieser Versuche wird an anderer Stelle ausführlich berichtet.

Während die Katheter bei allen übrigen Tieren bis zum Schluss der Versuche in beiden Richtungen durchgängig blieben, war bei einem Hund 8 h nach Operationsende keine Blutentnahme mehr möglich, wohl aber noch die

[1] C. E. Dent und J. A. Schilling, Biochem. J. *44*, 318 (1949).

[2] S. P. Bessmann, J. Magnes, P. Schwerin und H. Waelsch, J. Biol. Chem. *175*, 817 (1948).

[3] A. E. Denton, S. N. Gershoff und C. A. Elvehjem, J. Biol. Chem. *204*, 731 (1953).

[1] Der Firma Chas. Pfizer danken wir für Combiotic, der Firma Dr. W. Benend für Thrombocid.

Injektion beliebiger Flüssigkeitsmengen. Offenbar saugte sich der nur in diesem Fall verwendete, zu dünne PVC.-Katheter (innerer ⌀ 0,5 mm, äusserer ⌀ 1 mm) beim Anziehen des Spritzenkolbens an der Portalwand fest. Um derartige Schwierigkeiten – auch eventuell mit stärkeren Kathetern – bei chronischen Versuchen zu vermeiden, erscheint, neben einer Silikonisierung zur grösseren Sicherheit vor Blutgerinnung, eine seitliche Fensterung des in der Vene liegenden Katheterendes zweckmässig.

Eine von uns anfangs befürchtete Schädigung des von der Gefässunterbindung betroffenen Ileumstückes war nicht zu beobachten. Bei der an einem Tier zur Entfernung des Katheters unternommenen Relaparatomie zeigte der entsprechende Abschnitt keinen Unterschied in Konsistenz und Farbe zum übrigen Dünndarm. Die Blutversorgung scheint von Anastomosen übernommen zu werden.

In drei Fällen entfernten wir die Katheter ohne Eröffnung der Bauchhöhle perkutan durch langsames Herausziehen unter starkem Eindrücken der Bauchdecken. Schockreaktionen traten dabei nicht auf. Alle Versuchstiere überlebten.

Der Vorteil des beschriebenen Verfahrens gegenüber dem von A.E. Denton und Mitarbeitern liegt in dem technisch einfacheren, leberfernen Vorgehen, mit dem die gleichen experimentellen Ergebnisse erreicht werden können.

P. W. Jungblut, Beatrix Lohmann, R. Schober und F. Turba

Staatliche Milchwirtschaftliche Lehr- und Forschungsanstalt Wangen, Allgäu, den 15. Februar 1955.

Summary

A method is described for the introduction of a PVC.-Catheter into the portal vein of dogs. The catheter is introduced into one of the mesenteric veins of the ileum and pushed through the vena mesenterica communis until the portal vein is reached. The catheter, the end of which is fixed to the skin on the outside, can be removed without any injury to the animal by just drawing it out through the skin. The method can be applied for taking blood at various intervals during experiments on absorption, measurement of blood pressure in the portal vein and its branches, for the injection of substances directly into the liver, etc., on unanaesthetized animals.

Informations - Informationen - Informazioni - Notes

STUDIORUM PROGRESSUS

Influence de la β-mercaptoéthylamine sur la réponse de l'intestin grêle du rat à une irradiation rœntgénienne localisée

Par P. Desaive et Josephine Varetto-Denoël[1]

Historique de la question. On sait avec certitude que la β-mercaptoéthylamine ($SH–CH_2–CH_2–NH_2$) étudiée par Bacq et ses collaborateurs[2] protège à 100% contre une dose totale de 700 r, des Souris C 57 noires qui seraient à coup sûr tuées en 8 à 15 jours par cette irradiation *in toto*; on a par ailleurs de bonnes raisons de penser que cette amine si remarquable agit dans un sens analogue à celui d'autres substances, comme le cyanure de potassium et la cystéine, dont l'action protectrice – bien que moins marquée – a été connue plus tôt; et, comme le croit très justement Bacq, on est en droit d'admettre que la radioprotection réalisée par des produits tels que ceux que nous venons de citer est le résultat non pas d'une altération qualitative, mais d'une modification quantitative des effets des rayons X, à la faveur d'un phénomène de compétition à l'égard des radicaux libres.

Le mécanisme intime de la radioprotection chimique reste cependant l'objet de nombreuses et passionnantes discussions. Pour Betz[1] le KCN provoquerait – par voie endocrinienne – une diminution de la réaction hypophyso-surrénalienne qui succède à toute irritation; pour Cronkite, Brecher et Chapman[2], la cystéine agirait en protégeant un facteur de régénération qui pourrait, d'après Maisin et ses collaborateurs[3], avoir le foie pour origine. Gerebtzoff et Bacq[4], dans un travail récent qu'ils ont eu l'amabilité de nous communiquer avant sa publication, ont étudié le comportement histologique du foie, de la rate, du thymus et de l'intestin grêle chez des Souris irradiées *in toto* à 700 r, avec ou sans protection et ont constaté que l'amine protège le foie, accélère la régénération de la rate et peut être du thymus; quant à l'intestin, ils n'y trouvent, après *6 h*, aucune différence entre les témoins irradiés et les protégés (respectivement 45 et 44 mitoses par champ en moyenne) mais observent, *après 4 jours*, une régénération plus sérieuse chez les protégés (83 mitoses par champ contre 61 chez les non-protégés); Gerebtzoff et Bacq tirent de leur expérience la conclusion que la β-mercaptoéthylamine exerce avant tout ses effets dans le sens d'une réparation plus hâtive des tissus irradiés et estiment eux aussi que la substance qui aide à cette régénération siège vraisemblablement dans le foie. Tout récemment, Straube et Patt[5] ont confirmé les effets remarquables de la

[1] Université de Liège (Travail du Centre anticancéreux de l'Université de Liège et du Centre national belge pour l'étude de la croissance normale et pathologique).

[2] Z. M. Bacq, G. Dechamps, P. Fischer, A. Herve, H. le Bihan, J. Lecomte, M. Pirotte et P. Rayet, Science *117*, 633 (1953).

[1] H. Betz, C. r. Soc. biol. *1444*, 593 (1950).

[2] E. P. Cronkite, G. Brecher et W. H. Chapman, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *76*, 396 (1951).

[3] J. H. Maisin, G. Lambert, M. Mandart et H. Maisin, Nature *171*, 971 (1953).

[4] M. A. Gerebtzoff et Z. M. Bacq, *Examen histopathologique de Souris irradiées après Cystéamine* (sous presse).

[5] R. L. Straube et H. M. Patt, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *84*, 702 (1953).

cystéinamine qui est équimoléculairement 5 fois supérieure à la cystéine. Enfin, PATT, VOGEL et CLARK[1] ont pu démontrer que l'action protectrice de la cystéine varie en sens inverse de la densité ionique, phénomène qui est comparable à ce qui a été noté sous l'influence de l'oxygène.

Pour notre part, *et en nous basant exclusivement sur des irradiations localisées à certains organes*, nous pensons qu'il ne faut pas trop rapidement dénier au radioprotecteur un effet direct absolu. Dans un tissu irradié, les éléments générateurs – follicules primordinaux dans le cortex ovarien, spermatogonies dans l'épithélium testiculaire, cellules des cryptes dans l'intestin grêle, cellules basales dans l'épiderme – sont de loin les plus intéressants: si la dose de rayons X donnée – *in loco* ou *in toto* – n'atteint pas le seuil (variable d'un tissu à l'autre et peut-être d'un animal à l'autre) à partir duquel la destruction est totale et ne peut être sauvée par aucun protecteur (par exemple 3000 r pour l'ovaire irradié de Lapine [DESAIVE[2]], 900 r pour l'ovaire de Souris irradié en totalité [DESAIVE, BACQ et HERVE[3]]), un certain nombre de ces cellules résistent et reconstituent le système organique dont elles représentent la source de renouvellement; en irradiation simple, ce nombre est fixé par le hasard, en application de la théorie des cibles, ou par des conditions métaboliques déterminées (c'est le cas notamment pour le follicule primordial de l'ovaire); en irradiation précédée de l'introduction d'un protecteur chimique, cette quantité peut, à notre avis, être d'emblée plus élevée. Pour quelle raison? Nous n'en savons encore rien, mais il serait prématuré d'écarter cette influence locale au profit exclusif d'une action favorisant la régénération. D'ailleurs, il a été démontré à plusieurs reprises que les radioprotecteurs exercent une influence directe sur le comportement de certaines cellules. S. CHEVREMONT, COMHAIRE et M. CHEVREMONT notamment[4] ont montré que la β-mercaptoéthylamine inhibe la croissance des cultures de tissus en altérant la cytodiérèse (par une action que ces auteurs localisent au cytoplasme et, à un degré moindre, au chondriome) et en troublant la migration des cellules en intercinèse.

La β-mercaptoéthylamine est donc capable d'apporter à la structure cytoplasmique des cellules en intercinèse ou en cinèse d'importantes modifications. Celles-ci sont-elles de nature à modifier l'effet direct ou indirect des photons X sur la cellule considérée? La question reste ouverte. Certes, quelques expériences s'opposent apparemment à cette conception de l'action protectrice localisée de la cystéamine. KAPLAN et LYON[5] n'ont pu empêcher par la cystéamine les effets mutagènes des rayons X sur la Drosophile; craignant que cet échec ne soit dû à la rapide destruction de l'amine par les humeurs de cet insecte, ces auteurs ont alors étudié, chez la Souris, les effets de la cystéamine sur l'induction du facteur léthal dominant par irradiation à 500 r des testicules, et ils n'ont observé aucune différence entre les mâles témoins et les protégés quant aux modifications apportées par les rayons X à leur fertilité, et quant à l'état histologique – au 40e jour – des testicules histologiquement examinés. Mais nous avons déjà fait observer que l'action protectrice locale de la β-mercaptoéthylamine ne peut être qu'immédiate, qu'elle est rapidement camouflée par l'intensité des processus régénératifs qui, bien que plus intenses et plus précoces chez les protégés, restent suffisemment élevés chez les non-protégés pour que, du seul point de vue fonctionnel, aucune différence ne puisse être surprise, après un certain temps, entre protégés et non-protégés. Cette manière de voir est clairement démontrée par nos expériences sur le testicule de Souris, et par celles de HERVE et NEUKOMM[1] sur la tumeur de CASPARI de la Souris; il n'y a guère que l'ovaire – dont l'appareil folliculaire est régénéré par un ensemble de follicules primordiaux dont le nombre ne varie habituellement plus chez l'adulte – qui puisse, par la démonstration de l'élévation – sous l'influence de la cystéamine – du seuil de destruction de ces organites, apporter la preuve formelle de l'action protectrice génitale de cette substance (DESAIVE[2]).

Tel qu'il se présente à l'heure actuelle, le problème que pose la définition du mécanisme de la radioprotection est loin d'être résolu. C'est la raison pour laquelle nous avons cru utile d'apporter au débat le résultat d'une étude récente que nous avons faite[3] sur les effets que le radioprotecteur très puissant qu'est la β-mercaptoéthylamine, si parfaitement mise au point par BACQ et ses collaborateurs et synthétisée par la firme belge Labaz, excerce à l'égard d'une irradiation rœntgénienne portant directement sur des éléments générateurs au moins aussi sensibles que les spermatogonies et les follicules primordiaux, à savoir les cellules des cryptes de l'intestin supérieur du Rat, dont nous allons, au préalable, rappeler les caractères radiobiologiques.

Radiobiologie de l'intestin grêle. L'intestin grêle est extrêmement radiosensible. Les lésions radiologiques de cet organe se marquent au niveau de ses éléments lymphoïdes (HEINECKE[4]) et de ses formations glandulaires épithéliales (REGAUD, NOGIER et LACASSAGNE[5]). Une description détaillée de ces altérations intestinales a été donnée par ENGELSTAD[6] et reprise avec des considérations personnelles et une importante bibliographie par FRIEDMAN[7] qui a, en outre, consacré aux modifications apportées par les rayons X à la dynamique de la muqueuse intestinale d'intéressants travaux, soit seul[8], soit en collaboration avec WEBBER et CRAIG[9].

Les radiolésions épithéliales du grêle, dont nous empruntons la description aux mémoires de FRIEDMAN, consistent en premier lieu en un œdème cellulaire précoce suivi de phénomènes dégénératifs, combinés à une hyperémie du stroma, à des hémorragies et à des infiltrations leucocytaires. Ces dernières altérations comprennent, dans l'ordre des gravités croissantes: œdème, gonflement et vacuolisation du noyau et du cytoplasme des cellules bordantes, désintégration cellulaire avec picnose ou caryorrhexis, cytolyse ou nécrose, et enfin, atrophie définitive de la muqueuse. Habituellement s'installe une hypersécrétion mucigène avec augmentation de volume

[1] H. M. PATT, H. H. VOGEL et J. W. CLARK, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. *84*, 193 (1953).

[2] P. DESAIVE, Communication 7e Congr. internat. Radiol., Copenhague 1953, Acta Radiologica *41*, 545 (1954).

[3] P. DESAIVE, Z. M. BACQ et A. HERVE, Science *117*, 633 (1953).

[4] S. CHEVREMONT, S. COMHAIRE et M. CHEVREMONT, Arch. Biol. *64*, 399 (1953).

[5] W. D. KAPLAN et MARY F. LYON, Science *118*, 776, 777 (1953).

[1] A. HERVE et S. NEUKOMM, Commun. 7e Congr. internat. Radiol. Copenhague 1953.

[2] P. DESAIVE, Communication 7e Congr. internat. Radiol., Copenhague 1953, Acta Radiologica *41*, 545 (1954).

[3] P. DESAIVE, Z. BACQ et A. HERVE, J. belge Radiol. *36*, 505 (1953).

[4] H. HEINECKE, Münch. Med. Wschr. *51*, 785 (1904).

[5] CL. REGAUD, TH. NOGIER et A. LACASSAGNE, Arch. Electr. Med. *20*, 321 (1912).

[6] R. B. ENGELSTAD, Strahlentherapie *53*, 139 (1935); Amer. J. Röntgenol. *40*, 243 (1938).

[7] N. B. FRIEDMAN, Arch. Pathology *34*, 749 (1942).

[8] N. B. FRIEDMAN, J. Exper. Med. *81*, 558 (1945).

[9] B. WEBBER, B. R. CRAIG et N. B. FRIEDMAN, Cancer *4*, 1250 (1951).

des cellules en gobelet; mais à dose plus élevée, ces cellules disparaissent. Les éléments de réparation, qui occupent les cryptes, cessent rapidement de se diviser: mais les mitoses réapparaissent après quelques jours, plus nombreuses d'après Chrom, altérées d'après Lazarus-Barlow et d'après Dawson. Dustin[1] a observé dans l'intestin irradié des inclusions cellulaires fortement colorées par l'hématoxyline ferrique, qui cessent d'être visibles dès le retour des divisions mitotiques normales.

Engelstad d'une part, Warren et Friedman[2] d'autre part, ont noté des formations anormales consistant en cellules cubiques souvent en mitoses, cellules géantes et en syncytia, qu'ils admettent être de signification régénérative et qui sont peut être comparables aux cellules géantes que Kindred[3] a décrites dans les testicules, et nous mêmes[4] dans les ovaires d'animaux traités par les ypérites à l'azote.

En ce qui concerne plus spécialement la dynamique des cellules cryptiques, Friedman a observé que les rayons X, de même que les dérivés ypérités, suppriment la division cellulaire de restauration et sa conséquence immédiate, à savoir: la migration des cellules jeunes des cryptes vers les villosités; mais ces photons ne peuvent en arrêter la différentiation, de sorte que tout de suite après l'irradiation, les éléments générateurs des cryptes évoluent sur place vers la constitution de cellules en gobelet, et donnent ainsi aux culs-de-sac muqueux un aspect secrétoire que seul montre, dans des conditions normales, l'épithélium des villosités proprement dites.

Ces caractères radiobiologiques de l'intestin grêle proximal nous ont paru de nature à nous permettre de compléter nos observations sur les conséquences de l'introduction d'un radioprotecteur chimique tel que la cystéamine chez des Rats irradiés au niveau exclusif de l'étage supérieur de l'abdomen.

Matériel et techniques. Nous avons utilisé des Rats blancs provenant de notre élevage du Centre anticancéreux de Liège. Tous les animaux traités, d'un poids de 175 à 225 g, ont été préalablement anesthésiés par une faible dose intra-péritonéale de Nembutal. L'irradiation a été pratiquée au moyen d'un Stabilivolt Siemens, avec les constantes suivantes:

Tension: 180 kV
Intensité: 20 mA
Filtration: ½ mm, cuivre
Distance focale: 50 cm
Dose: 500 r (mesurée à la peau au moyen d'un dosimètre de Hammer).

Le champ d'irradiation a été dessiné de manière à intéresser uniquement la région duodéno-jéjunale, le reste de l'animal, fixé sur le dos, étant protégé par des caches de plomb.

Le radioprotecteur chimique utilisé: la β-mercaptoéthylamine (1573 Labaz) a été injectée à la dose de 15 mg dans la cavité péritonéale, une minute avant le début de l'irradiation.

Pour éviter la cause d'erreur qu'introduiraient, dans la comparaison entre animal irradié et animal irradié après protection, de faibles différences de doses dues à des modifications accidentelles (de toute manière très réduites) des caractères physiques des irradiations pratiquées, nous avons, de manière systématique, irradié simultanément le témoin et le protégé, attachés tous deux sur le même support, l'axe du faisceau radiant étant normal à l'espace virtuel séparant les deux animaux.

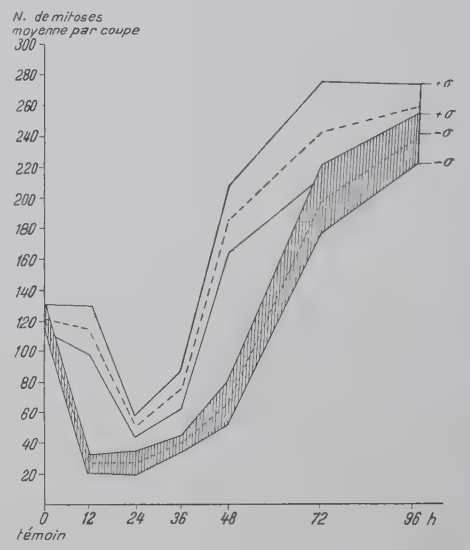


Fig. 1. Evolution des mitoses intestinales après irradiation locale, avec (+ – – – +) ou sans (o.....o) protection par la β-mercaptoéthylamine (les traits pleins enveloppant les deux courbes correspondent aux limites inférieures et supérieures des σ).

Nous avons sacrifié les rats après 12, 24, 36, 48, 72 et 96 h, en partant de la notion établie par nos prédécesseurs et notamment par Friedman, d'après laquelle à la dose de 500 r, le nombre des mitoses tombe presque à zero après 24 h, mais reprend un taux normal ou même supérieur à la normale à partir de la 72e h.

Dans chacune de nos six séries chronologiques, nous avons irradié trois paires de Rats (les paires étant de même sexe et comprenant toujours un témoin et un protégé), et portant les indications suivantes:

12 h (1), 12 h (3), 12 h (5) pour les témoins,
12 h (2), 12 h (4), 12 h (6) pour les protégés,

la même numération étant adoptée pour les autres séries: 24, 36, 48, 72 et 96 h.

Sacrifiées simultanément au Nembutal, au moment choisi, les différentes paires de Rats ont été soigneusement autopsiées; sur chaque animal nous avons prélevé la rate, le foie, 1 testicule ou 1 ovaire, une surrénale, et quatre fragments de la portion terminale du duodénum.

L'intestin a été fixé au Bouin, inclus dans la paraffine, débité en coupes de 4 μ et coloré par l'hématoxyline ferrique après mordançage dans l'alun de fer; la différentiation a été poussée très loin de manière à mettre parfaitement en évidence les images mitotiques.

Dans chaque paire d'intestins – témoin irradié et irradié après protection – nous avons choisi des coupes de dimensions aussi voisines que possible et nous avons compté les mitoses présentes dans ces coupes; il nous a paru que cette manière de procéder était supérieure à celle qui consiste à numérer les mitoses par groupes de 1000 cellules épithéliales cryptiques, en raison tout spécialement de la faible quantité de cellules en division et de l'irrégularité de leur répartition dans les séries de 12 et de 24 h.

Bien entendu, nous avons au préalable compté des mitoses chez un certain nombre de Rats témoins, non irradiés, de notre élévage; et le résultat moyen de ces

[1] A. P. Dustin, Bull. Assoc. Anatom. *28*, 249 (1932).
[2] Warren et N. B. Friedman, cités par Friedman, J. Exper. Med. *81*, 558 (1945).
[3] J. E. Kindred, J. Exp. Zoology *121*, 225 (1952).
[4] P. Desaive, Communication 41e Réun. Anatom., Gênes, avril, 1954.

dernières énumérations a servi de point de départ à nos courbes mitotiques après irradiation, avec ou sans protection.

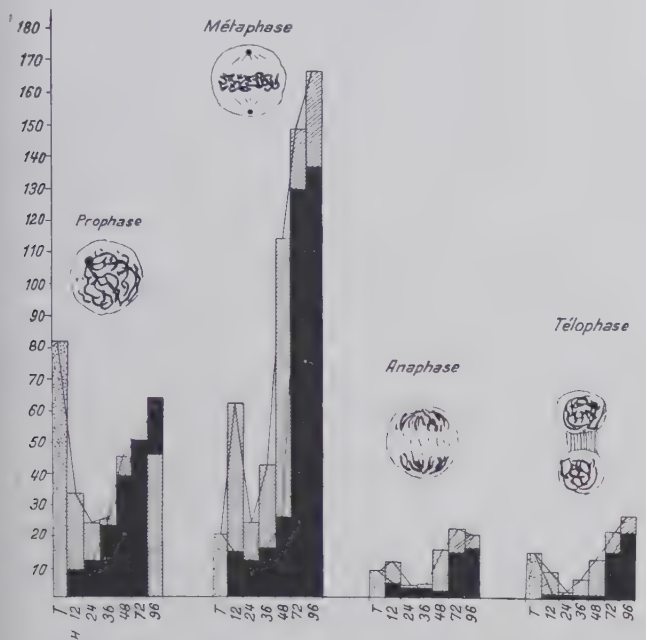


Fig. 2. Déroulement des différentes phases de la mitose après irradiation locale avec ▨ protection par la β-mercaptoéthylamine ou sans ■.

Enfin, dans l'établissement des indices mitotiques, nous avons systématiquement calculé l'erreur statistique en utilisant la formule

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma (p-q)^2}{n\,(n-1)}}\,.$$

Résultats expérimentaux. a) Calcul des nombres moyens de mitoses (nombre total et nombres des différentes phases mitotiques) par coupe de duodénum, chez des Rats non irradiés.

Pratiqués sur 8 animaux, 4 mâles et 4 femelles, ce calcul nous a donné les résultats suivants:

Table I

Classement des Rats	Nombre total des mitoses	Pro-phases	Méta-phases	Ana-phases	Télo-phases
TA 1	137	75	30	7	25
TA 2	118	68	21	11	18
TA 3	98	67	16	7	8
TA 4	97	67	11	6	13
TA 5	128	88	19	9	12
TA 6	101	73	19	6	3
TA 7	156	102	24	11	19
TA 8	148	105	18	9	16
Moyennes . .	122,87	80,62	19,7	8,25	14,25
	(= 123±8,1)	(= 81)	(= 20)	(= 8)	(= 14)

Le nombre total moyen de mitoses intestinales par coupe que nous avons trouvé = 123 ± σ = 8,1, est inférieur à celui: 180 à 200 que WEBBER, CRAIG et FRIEDMAN ont signalé dans leur mémoire de 1951; cette différence tient peut être à la race de l'animal, au système d'alimentation auquel il est soumis ou à d'autres causes encore; elle a d'ailleurs peu d'importance, puisque la valeur de base que nous avons trouvée sert uniquement de point de départ à des mesures comparatives sur animaux irradiés appartenant à la même souche.

b) Calcul du nombre total moyen et des nombres moyens de formes mitotiques par coupe de duodénum irradié, sans protection chimique ou après protection par la β-mercaptoéthylamine.

Considérons en premier lieu les nombres totaux de mitoses observées de la 12e à la 96e h après irradiation du duodénum, sans ou avec protection par la β-mercaptoéthylamine. Nous avons reproduit sur le schéma n° 1 les courbes des deux groupes de valeurs en tenant compte des σ en plus ou en moins; le seul examen de ces courbes suffit déjà à montrer l'influence considérable du radioprotecteur sur le déroulement des processus mitotiques après irradiation localisée de l'intestin supérieur. Considérons de plus près chacun des deux tracés.

Chez l'animal non protégé, les divisions cellulaires diminuent très rapidement dès les premières heures qui suivent l'irradiation: de 123, leur nombre tombe à 27 après 12 h et se maintient à ce taux après 24 h; à partir de la 36e cependant, les mitoses deviennent plus nombreuses; nous en comptons 40 à la 36e h, et 67 à la 48e h; mais ce n'est que le 3e jour que la régénération épithéliale se manifeste dans toute son intensité, dépasse le taux normal et accentue ce mouvement au 4e jour.

Chez le Rat protégé, la chute des mitoses est nettement plus lente: il en reste environ 115 à la 12e heure, et beaucoup moins intense, puisqu'après 24 h nous en comptons 51; de plus, la régénération, sans que nous puissions affirmer qu'elle soit plus précoce – puisque c'est également à la 36e h que les Rats de ce groupe montrent un premier relèvement de leur courbe mitotique – est d'emblée plus importante, les duodénums prélevés après 48 h permettant déjà de compter un nombre de divisions nettement supérieur à la normale. A partir du 3e jour, la différence s'atténue entre les deux courbes, qui deviennent statistiquement identiques à la 96e h, comme l'indique clairement sur le schéma, la confusion du σ inférieur de la courbe avec protection et du σ supérieur de la courbe sans protection.

En conclusion, il nous est permis d'écrire que la *β-mercaptoéthylamine radioprotège immédiatement un certain nombre de cellules en mitose et, en outre, favorise, accélère et accentue la régénération de l'épithélium intestinal.*

Examinons de plus près l'évolution des mitoses et comparons chez l'animal irradié et chez l'animal irradié après protection *la valeur relative des quatre phases classiques de la division cellulaire.* Nous avons représenté sur le schéma n° 2 le comportement de chacune de ces phases de la 12e à la 96e h après l'irradiation; les temps sont en abcisses et les nombres de prophases, métaphases, anaphases et télophases en ordonnées; les rectangles sombres correspondent aux duodénums irradiés sans protection; les rectangles hachurés schématisent le nombre de ces images observées *en supplément* dans les intestins irradiés après protection: En effet, sauf dans un seul cas à savoir les nombres de prophases à la 96° h –, le duodénum protégé contient à tout instant, par rapport au duodénum non protégé, un nombre plus considérable de figures mitotiques, quel que soit le stade considéré. A noter que les rectangles en pointillé donnent les nombres observés dans un intestin non irradié.

Nous avons constaté ce qui suit:

1° Le nombre des prophases décroît rapidement (et plus rapidement pour l'intestin non protégé) jusqu'à la 24e h; puis il augmente régulièrement mais n'a pas, à la 96e h, reproduit la valeur du témoin.

2° Les métaphases se comportent différemment dans l'intestin irradié témoin et dans l'intestin protégé; dans le premier, la chute initiale, dès la 12e h, en dessous du

Tableau II

Rats non protégés					Rats protégés				
Nombres Totaux	Pro-phases	Méta-phases	Ana-phases	Télo-phases	Nombres Totaux	Pro-phases	Méta-phases	Ana-phases	Télo-phases
1re série après 12 h									
Rats 12 (1) 12 (3) 12 (5)	27 ± 6,6	7	14,5	4,5	1	Rats 12 (2) 12 (4) 12 (6)	115 ± 15,5	32,5	63	11	7
2e série après 24 h									
Rats 24 (1) 24 (3) 24 (5)	26 ± 7,83	11	11	3	1	Rats 24 (2) 24 (4) 24 (6)	51 ± 7,2	22	23	4	2
3e série après 36 h									
Rats 36 (1) 36 (3) 36 (5)	40 ± 5,3	21	15	3	1	Rats 36 (2) 36 (4) 36 (6)	75 ± 12,6	22,5	43	4,5	5
4e série après 48 h									
Rats 48 (1) 48 (3) 48 (5)	67 ± 14,3	39	25	2	1	Rats 48 (2) 48 (4) 48 (6)	186 ± 22	45	114	15	12
5e série après 72 h									
Rats 72 (1) 72 (3) 72 (5)	199 ± 22,4	50	120	14	15	Rats 72 (2) 72 (4) 72 (6)	245,5 ± 32,5	51	149,5	23	22
6e série après 96 h									
Rats 96 (1) 96 (3) 96 (5)	237 ± 12	63	136	16	21	Rats 96 (2) 96 (4) 96 (6)	258 ± 13,7	45	167	20	26

niveau normal, est suivie, à partir de la 36e h, d'une élévation si considérable, que le nombre observé dépasse de loin le nombre témoin. Chez le deuxième, le nombre de métaphases ne descend jamais en dessous de la valeur de départ; au contraire, il s'élève notablement à la 12e h, diminue légèrement à la 24e, puis s'accroît à nouveau pour devenir à la 96e h 8 fois supérieur à la normale.

Tout se passe donc comme si l'irradiation avait pour conséquence de stopper les métaphases pendant un temps assez long pour que, dès la reprise des divisions normales des cellules épargnées par l'irradiation (cellules nettement plus nombreuses chez l'animal protégé), les métaphases nouvelles et normales rejoignent les métaphases bloquées et anormales et donnent ainsi l'impression – purement fictive – d'un accroissement absolu du nombre de ces figures mitotiques. Il est vraisemblable que ce phénomène, qu'accentue nettement le radioprotecteur employé, est lié à des altérations du chondriome ou du cytoplasme, qui se manifestent surtout à la métaphase.

3° Les anaphases se comportent sensiblement comme les métaphases: mais l'allongement apparent des durées de ces dernières a pour conséquence ce fait important que ce n'est qu'à partir de la 48e h — dans l'intestin protégé – et même de la 72e h – dans l'intestin non protégé – que le nombre de ces phases rejoint puis dépasse le nombre normal.

4° Ces dernières observations s'appliquent également aux télophases, à cette différence près que, même après protection, le nombre de ces figures diminue dès la 12e h et ne revient approximativement à la normale qu'à partir de la 72e h.

c) *Etude cytologique des intestins irradiés sans ou après protection.* Dans le duodénum de Rat irradié à 500 r, nous avons retrouvé les images classiques décrites par nos prédécesseurs: œdème cellulaire initial, apparition de phénomènes dégénératifs cytoplasmiques et nucléaires, disparition rapide des mitoses, différentiation sur place des cellules fraîchement issues des divisions immédiatement antérieures à l'irradiation, avec, pour conséquence, la formation anormale de cellules en gobelet à l'intérieur des cryptes.

Par contre, dans le duodénum irradié après protection par la cystéinamine, la persistance des mitoses a pour conséquence le maintien partiel du processus de migration des cellules jeunes vers les villosités: le nombre des éléments en gobelet que présentent les cryptes est, dès lors, beaucoup plus réduit.

Or cette constatation est d'un intérêt considérable; *elle prouve en effet que la β-mercaptoéthylamine n'agit pas uniquement en favorisant la régénération; elle exerce une*

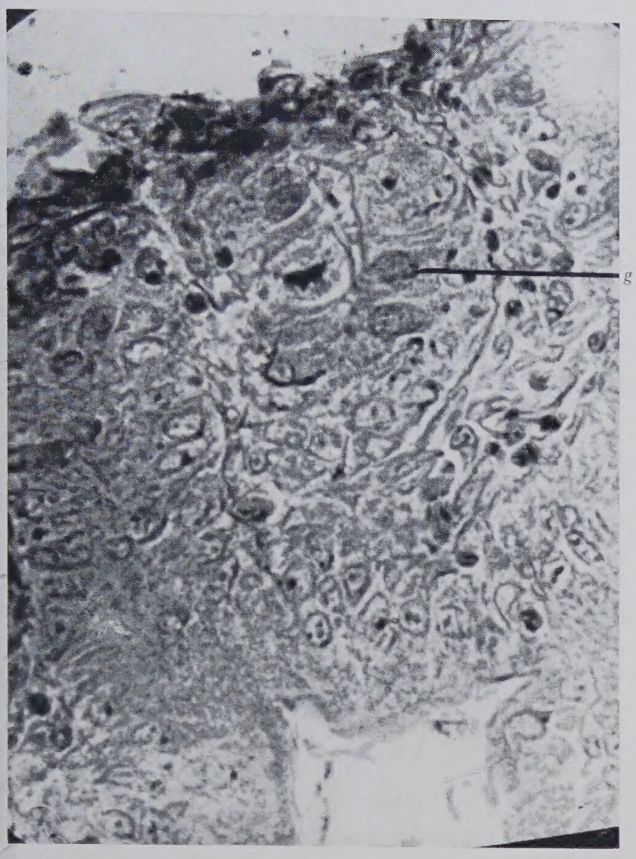


Fig. 3. Duodénum de Rat irradié (500 r). Prélèvement 24 h après l'irradiation (*g* = cellule en gobelet).

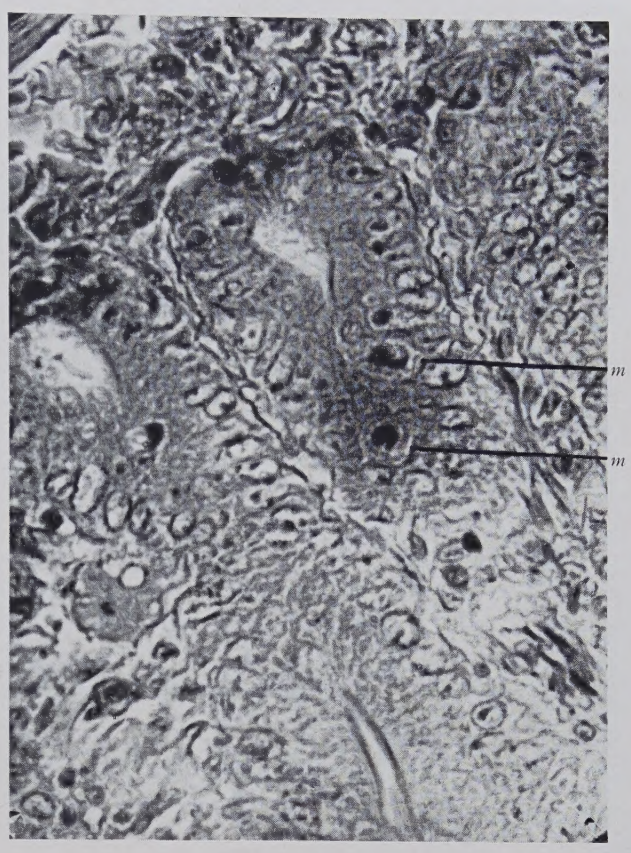


Fig. 4. Duodénum de Rat irradié (500 r). Prélèvement 24 h après l'irradiation, immédiatement précédée de l'injection intra-péritonéale de 15 mg de Becaptan (*m* = mitoses).

réelle action protectrice locale, puisqu'elle empêche les rayons X de bloquer les intentions mitotiques d'un certain nombre de cellules génératrices.

Bien entendu, on peut admettre que les substances qui assurent après irradiation la régénération tissulaire – autrement dit les divisions des éléments régénérateurs – sont également celles qui règlent la division de ces mêmes éléments dans les conditions normales: en permettant à l'organisme d'économiser ces substances, le radioprotecteur favorise à la fois la poursuite des processus normaux de division (effet immédiat) et la reprise plus précoce et plus active de la régénération (effet tardif).

Les recherches actuellement poursuivies dans le but d'élucider la nature exacte de ces substances, fourniront vraisemblablement, dans un avenir prochain, une explication satisfaisante aux phénomènes ci-dessus décrits.

Discussion. Des expériences que nous venons de relater, il ressort:

a) que l'intestin grêle supérieur du Rat, irradié localement à 500 r, montre 1° un abaissement dès la 12e h du nombre total des mitoses, qui réapparaissent dès la 36e h pour atteindre au 4e jour une valeur supérieure à la normale; 2° un accroissement relatif considérable du nombre des métaphases, à la faveur d'un allongement de la durée de ce stade;

b) que le même intestin irradié à dose identique, mais après protection par la β-mercaptoéthylamine, montre: 1° une chute moins rapide et une reprise plus précoce et plus intense du nombre total des mitoses; 2° une accentuation si marquée de la durée des métaphases que celles-ci sont plus nombreuses, à la 12e h, que dans l'intestin normal; 3° la suppression de l'une des plus nettes caractéristiques de l'irradiation, à savoir l'apparition, dans les cryptes, de cellules en gobelet à la faveur de la persistance de la différentiation coïncidant avec l'arrêt de la division.

En somme, la β-mercaptoéthylamine, injectée par voie intra-péritonéale immédiatement avant une irradiation à 500 r dirigée sur le duodénum, limite considérablement les effets des rayons X; nous retrouvons ici une action que nous avons déjà signalée au niveau des éléments générateurs de l'appareil folliculaire de la Lapine adulte et de l'épithélium séminal de la Souris, et que Herve et Neukomm ont également observée après irradiation chez la Souris, de la tumeur mammaire de Caspari.

La dissociation que nous avons faite plus haut entre l'effet immédiat, franchement radioprotecteur, de l'amine considérée et l'effet plus tardif d'accentuation des processus de régénération, ne peut encore, à l'heure présente, être clairement élucidée.

Toutefois, nous ne voyons pas comment, chez l'animal irradié et protégé, il serait possible d'interpréter, autrement que par une action protectrice locale directe (c'est-à-dire dont profitent sans délai des nombres déterminés de cellules génératrices et de leurs produits immédiats), l'accroissement apparent considérable du nombre des métaphases (dont les formes, bloquées au moment de l'irradiation, sont rejointes par de nombreux éléments nouveaux qui ont sans encombre terminé leur prophase) et le maintien de la migration (supprimée chez l'animal non protégé) des cellules glandulaires jeunes, déjà différenciées, des cryptes génératrices vers les villosités.

Bien entendu, il reste dans ce domaine des points encore obscurs; nous nous efforçons, en ce moment, de rechercher notamment dans quelle mesure la cystéamine pourrait, à elle seule, altérer le rythme des cinèses intestinales, et comment réagirait à son égard l'intestin normal ou irradié *avant* l'injection intra-péritonéale de ce radioprotecteur.

Enfin, nous portons notre attention sur l'intervention de la β-mercaptoéthylamine dans l'apparition post-radiologique de mitoses atypiques.

Summary

Intra-peritoneal injections of 15 mg of B-mercaptoethylamine in rats, with an average weight of 200 g, protect the small intestine against a local irradiation of 500 r on the antero-upper portion of the abdomen.

This protection is proved mainly, as compared with the control, by a smaller decrease of cells still in mitosis after 12 and 24 hours and of the migrant cells in resting stage, by a greater precocity and higher quantitative value of the post-radiation normal and subnormal mitotic processes, and by variations in the mitotic formula (namely, in protected animals, a relatively high increase in the amount of metaphases).

These experiments seem to prove a certain local and immediate action of the radio-protector, whose effects are not solely limited to the preparation of the generating system of the intestine for the later complete repair of the digestive epithelium.

Die Forschungslaboratorien der Sandoz A.G. haben einen entscheidenden Anteil an der Reindarstellung und Konstitutionsaufklärung der herzwirksamen Glykoside und leisteten wesentliche Beiträge zu deren pharmakologischen Erforschung.

Aus diesen grundlegenden Arbeiten resultierten für die Therapie der Herzkrankheiten folgende Spezialpräparate:

Acylanid
Cedilanid
Digilanid
Scillaren
Strophosid

SANDOZ

SANDOZ A.G.

ARTIA

Collection of Czechoslovak Chemical Communications

(Begründet von E. Votoček und J. Heyrovský)

In der Zeitschrift werden ausgewählte Arbeiten aus der tschechoslowakischen Zeitschrift Chemické listy auf dem Gebiet der Chemie und Biochemie in deutscher, englischer oder russischer Übersetzung veröffentlicht. Ausser diesen ungekürzten Originalmitteilungen wird über eine Reihe weiterer, nur in tschechischer Sprache veröffentlichter Arbeiten ausführlich referiert. Ein Jahrgang, bestehend aus 6 Heften, hat einen Umfang von etwa 1600 Seiten. Als Beilage enthält die Zeitschrift einmal jährlich ein vollständiges Verzeichnis aller Veröffentlichungen auf dem Gebiet der Polarographie.

Jährlicher Bezugspreis $ 8,50 oder Gegenwert in anderer Währung. Bestellungen können durch jede Buchhandlung oder bei Artia, 30 Ve Smečkách, Prague (Tschechoslowakei), erfolgen.

Redaktionskomitee

R. Brdička, J. Gašperík, V. Herout, J. Heyrovský, V. Hovorka, B. Keil, J. Koštíř, R. Lukeš, A. Okáč, J. Plíva, M. Protiva, J. Rudinger, J. Sicher, M. Streibl (Redaktor), E. Šorm (Vorsitzender), O. Wichterle, P. Zuman.

Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta

Seit 1943 offizielles Publikationsorgan des Schweiz. Vereins der Physiologen und Pharmakologen

Fasc. 4, (1954) enthält folgende Arbeiten:

Odette Achard et Verena M. Bucher: Courants d'action bulbaires à rythme respiratoire. – F. Gross und H. Kaufmann: Hemmung der analgetischen Wirkung von Morphin und Cliradon durch verschiedene Zucker und Zuckerabbauprodukte. – H. Thoelen und A. Pletscher: Die Wirkung von Calcium, Glucose und Fructose bei subakuter experimenteller Benzidinvergiftung. – A. Müller: Über die Verwendung des Castelli-Prinzips zur Geschwindigkeitsmessung. – H. Turrian, E. Grandjean et J.-L. Nicod: Une nouvelle méthode biologique permettant d'apprécier la fibrogénité d'une silicogène. – P. N. Witt: Ein biologischer Nachweis von Adrenochrom und seine mögliche Anwendung. – H. Isliker und G. Schönholzer: Die Antihistaminwirkung einiger Antipyretica.

Preis des Jahresabonnements: Fr. 40.–, zuzüglich Porto.
Vorzugspreis für wissenschaftliche Institute: Fr. 33.50, zuzüglich Porto

Abonnementsbestellungen nimmt Ihr Buchhändler entgegen oder

BENNO SCHWABE & CO · VERLAG · BASEL